

**Präparat- und Chargenvergleich von Kollagenhydrolysaten –  
biochemische Zusammensetzung und zelluläre Wirkung auf  
kultivierte humane synoviale Fibroblasten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Simons, Viktor-Samuel Werner Bernd  
aus Würzburg

Gießen 2018

---

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie  
(Labor für Experimentelle Orthopädie),  
unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Rickert,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Steinmeyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner

Tag der Disputation: 03.06.2019

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	- 1 -
1.1 Kollagenhydrolysate als Nahrungsergänzungsmittel	- 1 -
1.2 Physiologischer Gelenkaufbau	- 2 -
1.2.1 Gelenkknorpel	- 3 -
1.2.2 Gelenkkapsel und Synovia	- 4 -
1.3 Arthrose	- 6 -
1.3.1 Ätiologie	- 7 -
1.3.2 Pathogenese	- 8 -
1.3.3 Die Rolle der synovialen Inflammation	- 10 -
1.3.4 Zytokine, Chemokine, Entzündungsmediatoren und Enzyme	- 12 -
1.3.4.1 Proinflammatorische Zytokine	- 12 -
1.3.4.2 Chemokine	- 14 -
1.3.4.3 Entzündungsmediatoren	- 14 -
1.3.4.4 Enzymfamilien	- 16 -
1.3.5 Therapie	- 18 -
1.3.6 Wirkung von Kollagenhydrolysaten	- 19 -
1.3.6.1 <i>In vitro</i> -Studien von KH	- 20 -
1.3.6.2 <i>In vivo</i> -Studien von KH	- 25 -
1.4 Zielsetzung der Arbeit	- 29 -
<b>2 Material und Methoden</b>	- 31 -
2.1 Material	- 31 -
2.1.1 Probenmaterial	- 31 -
2.1.2 Patientenbeschreibung	- 31 -
2.1.3 Geräte	- 32 -
2.1.4 Software	- 34 -
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	- 35 -
2.1.6 Chemikalien	- 36 -
2.1.7 Lösungen und Puffer	- 42 -
2.1.8 Kollagenhydrolysate	- 44 -

---

2.2 Methoden	- 46 -
2.2.1 Biochemische Analyse der KH-Präparate	- 46 -
2.2.1.1 Reverse Phase-Festphasenextraktion	- 47 -
2.2.1.2 ICPL™-Derivatisierung	- 47 -
2.2.1.3 Fraktionierung (RP-HPLC)	- 48 -
2.2.1.4 MALDI-TOF-Massenspektromie	- 50 -
2.2.2 Zelluläre Wirkung der KH auf kultivierte FLS	- 51 -
2.2.2.1 Isolation und Kultivierung der FLS	- 51 -
2.2.2.2 Inkubation der FLS mit KH-Präparaten	- 52 -
2.2.2.3 Normalisierung der Messergebnisse	- 54 -
2.2.3 Vorversuche zur Wahl des S/N	- 54 -
2.2.3.1 Prüfung auf das Vorhandensein eines optimalen S/N	- 55 -
2.2.3.2 Vergleich von Gesamtzahl und dem prozentualen Anteil der reproduzierbaren Peaks bei unterschiedlichen S/N	- 55 -
2.2.4 Vorversuch: Vergleich der Standardkurven von TIMP-3-ELISA	- 56 -
2.2.5 Hauptversuch 1: Qualitativer Vergleich von KH-Präparaten	- 56 -
2.2.5.1 Reproduzierbarkeit der Messmethode	- 57 -
2.2.5.2 Ermittlung der reproduzierbaren Peaks	- 57 -
2.2.5.3 Auswertungsverfahren: Ermittlung von gemeinsamen reproduzierbaren Peaks bei verschiedenen KH-Präparaten bzw. Chargen	- 58 -
2.2.5.4 Referenzmessungen	- 58 -
2.2.5.5 Vergleich von zwei oder drei KH-Präparaten	- 59 -
2.2.6 Hauptversuch 2: Quantitativer Chargenvergleich mittels ICPL™	- 60 -
2.2.6.1 Auswertungsverfahren von ICPL™-markierten Proben	- 61 -
2.2.6.2 Chargenvergleich	- 62 -
2.2.6.3 Referenzmessung	- 62 -
2.2.7 Hauptversuch 3: Zelluläre Wirkung der KH-Präparate auf FLS	- 63 -
2.2.7.1 Freisetzung von Interleukinen	- 63 -
2.2.7.2 Gehalt von Matrix-Metalloproteinasen	- 64 -
2.2.7.3 Freisetzung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$	- 65 -
2.2.7.4 Freisetzung von Prostaglandin E <sub>2</sub>	- 65 -
2.2.7.5 Freisetzung von Stickstoffmonoxid	- 66 -



---

2.2.7.6 Gehalt von TIMP-3	- 67 -
2.2.7.7 Vergleich der zellulären Wirkung verschiedener KH auf FLS	- 67 -
2.3 Statistische Analyse	- 68 -
<b>3 Ergebnisse</b>	- 70 -
3.1 Vorversuche	- 70 -
3.1.1 Vorversuche zur Wahl des S/N	- 70 -
3.1.1.1 Prüfung auf das Vorhandensein eines optimalen S/N	- 70 -
3.1.1.2 Vergleiche von Gesamtzahl und dem prozentualen Anteil der reproduzierbaren Peaks bei unterschiedlichen S/N	- 71 -
3.1.2 Vorversuch Vergleich der Standardkurven von TIMP-3-ELISA in Nährmedium und „Reagent Diluent“	72 -
3.2 Hauptversuche	- 73 -
3.2.1 Hauptversuch 1: Qualitativer Vergleich von KH-Präparaten	- 73 -
3.2.2 Hauptversuch 1: Reproduzierbarkeit der Messmethode	- 73 -
3.2.3 Hauptversuch 1: Vergleich von zwei oder drei KH-Präparaten	- 74 -
3.2.3.1 Ergebnis Referenzmessungen	- 75 -
3.2.3.2 Ergebnis Vergleich von KH-Präparaten untersch. Hersteller	- 77 -
3.2.3.3 Ergebnis Chargenvergleiche von KH-Präparaten	- 81 -
3.2.3.4 Ergebnis Vergleich verschiedener KH-Präparate von Rousselot	- 85 -
3.2.4 Hauptversuch 2: Quantitativer Chargenvergleich mittels ICPL™	- 87 -
3.2.4.1 Ergebnis Referenzmessung	- 87 -
3.2.4.2 Ergebnis Chargenvergleiche	- 87 -
3.2.5 Hauptversuch 3: Zelluläre Wirkung der KH-Präparate auf FLS	- 89 -
3.2.5.1 Freisetzung von Interleukinen	- 89 -
3.2.5.2 Gehalt von Matrix-Metalloproteinasen im Nährmedium	- 91 -
3.2.5.3 Freisetzung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ im Nährmedium	- 92 -
3.2.5.4 Freisetzung von Prostaglandin E <sub>2</sub>	- 93 -
3.2.5.5 Freisetzung von Stickstoffmonoxid	- 93 -
3.2.5.6 Gehalt von TIMP-3 im Nährmedium	- 93 -
3.2.5.7 Vergleich der zellulären Wirkung verschiedener KH auf FLS	- 93 -

---

<b>4 Diskussion</b>	- 96 -
4.1 Methodik	- 97 -
4.1.1 Massenspektrometrische Analysen	- 97 -
4.1.2 Zellkulturversuch an synovialen Fibroblasten	- 102 -
4.2 Biochemische Zusammensetzung der Kollagenhydrolysate	- 102 -
4.3 Die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf synoviale Fibroblasten	- 105 -
4.4 Schlussfolgerungen	- 110 -
<b>5 Zusammenfassung</b>	- 112 -
<b>6 Summary</b>	- 113 -
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	- 114 -
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b>	- 120 -
<b>9 Tabellenverzeichnis</b>	- 122 -
<b>10 Literaturverzeichnis</b>	- 124 -
<b>11 Tabellarischer Anhang</b>	- 137 -
11.1 Hauptversuch 1: Qualitativer Vergleich von KH-Präparaten	- 137 -
11.1.1 Tab. Darstellung der reproduzierbaren Peaks der KH-Präparate	- 137 -
11.1.2 Exmpl. ausführliche Darstellung von KH-Präparatvergleichen	- 150 -
11.2 Hauptversuch 2: Quantitativer Chargenvergleich mittels ICPL™	- 157 -
11.3 Hauptversuch 3: Zelluläre Wirkung der KH-Präparate auf FLS	- 162 -
11.3.1 IL-6-Gehalt in den Nährmedien	- 162 -
11.3.2 IL-8-Gehalt in den Nährmedien	- 165 -
11.3.3 MMP-1-Gehalt in den Nährmedien	- 169 -
11.3.4 MMP-3-Gehalt in den Nährmedien	172 -
11.3.5 TIMP-3-Gehalt in den Nährmedien	- 176 -
<b>12 Graphischer Anhang</b>	- 180 -
12.1 Prüfung auf das Vorhandensein eines optimalen S/N	- 180 -
12.2 Hauptversuch 1 – Gel-like view-Diagramm	- 181 -

---

<b>13 Publikationsverzeichnis</b>	- 184 -
<b>14 Ehrenwörtliche Erklärung</b>	- 185 -
<b>15 Danksagung</b>	- 186 -

# 1 Einleitung

## 1.1 Kollagenhydrolysate als Nahrungsergänzungsmittel

Kollagenhydrolysate (KH) stellen ein Gemisch von Peptiden dar, die unter anderem als Nahrungsergänzungsmittel zur Prophylaxe und zur Behandlung von arthrotischen Gelenkerkrankungen eingesetzt werden [3, 89, 90]. Sie werden in der Regel durch die enzymatische Hydrolyse von Gelatine hergestellt, die ihrerseits meistens mittels chemischer Hydrolyse aus Kollagenen gewonnen wird [5, 66, 67, 94]. Im Gegensatz zu Gelatine sind KH in kaltem Wasser gut löslich, gelieren nicht und besitzen emulsionsstabilisierende Eigenschaften [66, 67]. Im Mittel liegt das Molekulargewicht von KH zwischen 2 bis 6 kDa [5, 67]. Ausgangssubstanz für die Herstellung von KH sind Kollagene, die die häufigsten (Struktur-) Proteine des Menschen darstellen [33, 66, 105].

Kollagene, siehe auch Kapitel 1.2.1, zeichnen sich durch ihre ausgesprochene Zugfestigkeit aus und finden sich in großen Mengen in Haut, Faszien, Sehnen und Knochen sowie in vielen weiteren Gewebetypen, wie beispielsweise dem hyalinen Gelenkknorpel [101]. Aufgrund der typischen periodischen Aminosäureabfolgen, aus denen sich Kollagene aufbauen, sind KH-Präparate besonders reich an Aminosäuren wie Glycin und Prolin [33, 94]; sie enthalten jedoch nicht alle essentiellen Aminosäuren [67]. Kollagenfragmente unter einer gewissen Größe liegen meistens als einzelne Polypeptide vor [105]. Die genaue Peptidzusammensetzung von KH-Präparaten ist unbekannt [105] und unterscheidet sich, wie Shadow et al. [89, 90] zeigen konnten, bei verschiedenen Präparaten deutlich voneinander, siehe auch Kapitel 1.3.6. KH ist daher eher als ein Überbegriff vieler unterschiedlicher kollagenhydrolysathaltiger Peptid-Mixturen anzusehen, die im Handel erhältlich sind [90, 105].

Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Peptidzusammensetzung von KH-Präparaten könnte neben verschiedenen Herstellungsmethoden, beispielsweise dem Einsatz unterschiedlicher Proteasen [66], auch die Verwendung von unterschiedlichem Ausgangsmaterial sein: So werden die für die Produktion von KH verwendeten Kollagene aus Knochen und Haut sowie Schuppen und Flossen verschiedener Wirbeltiere gewonnen [5, 39]. Am häufigsten stammen diese vom Rind oder Schwein; es findet sich jedoch auch eine Vielzahl an KH-Präparaten, die aus Geflügel oder Fisch hergestellt werden. Fisch-KH werden meist aus Nebenprodukten der Fischerei wie Fischabfällen

oder Beifang gewonnen, was die Heterogenität des Ausgangsmaterials der KH zusätzlich begünstigen dürfte [39, 117].

Nahrungsergänzungsmittel wie KH werden in der EU zu den Lebensmitteln gezählt [83]. Nach der Nahrungsmittelverordnung (NemV) sollen diese die allgemeine Ernährung ergänzen, indem sie bestimmte (Nähr-) Stoffe in erhöhten Konzentrationen bereitstellen. Zu diesem Zweck werden sie in bestimmten Dosierungen und in verschiedenen Darreichungsformen angeboten [114]. Die Bewerbung von Nahrungsergänzungsmitteln ist hinsichtlich der gesundheits- und nährwertbezogenen Angaben sowie zu Angaben über die Reduktion von Krankheitsrisiken in der EU durch die Health-Claims-Verordnung gesetzlich geregelt: Entsprechende Angaben sind demnach nur dann erlaubt, wenn sie von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. European Food Safety Authority, EFSA) nach wissenschaftlicher Überprüfung zugelassen worden sind [13]. KH, die aus Knochen von Schweinen oder Geflügel hergestellt werden, wurden von der EFSA für sicher befunden [22]. Ein Health-Claim für Kollagenhydrolysate zur Aufrechterhaltung gesunder Gelenke wurde jedoch von der EFSA im Jahr 2011 aufgrund mangelnder wissenschaftlicher Nachweise abgelehnt [21].

Generell werden KH als gut verträglich und nebenwirkungsarm beschrieben: So soll es weder Hinweise für eine toxische, mutagene, kanzerogene oder teratogene Wirkung geben, noch sollen KH über ein erhöhtes Allergierisiko oder schwerwiegende Wechselwirkungen mit Nahrungsbestandteilen oder Arzneimitteln verfügen [94]. Es wurde lediglich vereinzelt von leichten gastrointestinalen Nebenwirkungen wie Völlegefühl oder unangenehmem Geschmack nach Einnahme berichtet [34]. Im Gegensatz zu Arzneimitteln ist bei Nahrungsergänzungsmitteln keine Zulassung erforderlich, um im Handel vertrieben zu werden. Sie müssen lediglich dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit gemeldet werden [26]. Auf die Wirkung von KH bei arthrotischen Gelenkerkrankungen soll in Kapitel 1.3.6 näher eingegangen werden.

## 1.2 Physiologischer Gelenkaufbau

„Echte Gelenke“, auch Diarthrosen genannt, stellen eine bewegliche Verbindung von zwei oder mehreren Knochen dar, die durch einen mit Synovialflüssigkeit gefüllten Gelenkspalt voneinander getrennt sind und von einer Gelenkkapsel (Capsula articularis) umgeben werden [20, 92]. Die Gelenkflächen sind in der Regel mit hyalinem Knorpel

bedeckt [20]. Weiter lassen sich in einigen Gelenken zusätzliche Hilfsstrukturen wie Disci- oder Menisci articulares, Bursen und Labra articulares finden. Zur weiteren Stabilisierung finden sich außerdem intra- oder extraartikulär verlaufende Bänder [92].

### **1.2.1 Gelenkknorpel**

Aufgrund seiner glatten Oberfläche setzt der hyaline Gelenkknorpel die Reibung der miteinander artikulierenden Gelenkflächen herab. Durch seine viskoelastischen Eigenschaften sorgt er außerdem für eine gleichmäßige Übertragung der Druckkräfte auf den subchondralen Knochen [20, 92]. Hyaliner Knorpel besteht aus Knorpelzellen – postmitotischen Chondrozyten und einigen teilungsfähigen Chondroblasten – sowie der extrazellulären Matrix (EZM) [19, 20]. Beim ausgewachsenen Menschen ist er nicht vaskularisiert [19]. Die Ernährung und Sauerstoffversorgung findet ausschließlich durch Diffusion über die Synovia und das subchondrale Knochengewebe statt [19, 102]. Die Dicke des hyalinen Gelenkknorpels beträgt zwischen 0,2 und 6 mm [92], an stark belasteten Gelenken wie der Kniescheibe bisweilen sogar bis zu 8 mm [20]. Der hyaline Gelenkknorpel besitzt kein Perichondrium [19, 55]. Die Fähigkeit zur Regeneration von geschädigtem Gelenkknorpel ist stark limitiert, so dass Knorpelschäden, die einige mm<sup>2</sup> überschreiten, nicht mehr repariert werden können [20].

#### Chondrozyten und extrazelluläre Matrix

Die Knorpelzellen sind mesenchymalen Ursprungs [19]. In der extrazellulären Matrix (EZM) liegen die Chondrozyten einzeln oder in kleinen isogenen Zellgruppen vor [55] und sind maßgeblich sowohl an der Produktion als auch am Abbau der EZM beteiligt [19]. Die EZM macht über 80 % des Knorpelvolumens aus und ist für die viskoelastischen und mechanischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich. Sie besteht wiederum zu 80 % aus Wasser und zu 20 % aus organischen Molekülen, die sich vor allem den Kollagenen, Proteoglykanen oder Glykoproteinen zuordnen lassen [19].

#### Kollagene

Kollagene sind Strukturproteine, die eine hohe Zugfestigkeit aufweisen. Sie stellen die wichtigste Faserart der EZM dar und sind die am häufigsten vorkommenden Proteine

im menschlichen Körper. Man unterscheidet 28 verschiedene Kollagentypen, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen und in verschiedenen Geweben vorkommen [33, 101]. Allen Kollagenen gemein ist ihre Grundstruktur: Eine rechtsgängige Superhelix, die durch das Aneinanderlagern von drei linksgängigen  $\alpha$ -Peptidketten entsteht und durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird [33, 101]. Ihre typische Aminosäuresequenz ist Glycin-X-Y. An Stelle X steht zumeist Prolin und an Stelle Y zumeist Hydroxyprolin, Lysin oder Hydroxylysin. Prolin und Hydroxyprolin spielen mit ihrem zyklischen Aufbau eine wichtige Rolle bei der Bildung der Superhelix. Hydroxylysin kann über seine OH-Gruppe Mono- und Disaccharide binden [33]. Grob lassen sich Kollagene in fibrilläre und fibrillen-assoziierte Kollagene einteilen. Zu den Kollagenen vom fibrillären Typ zählen unter anderem Kollagen Typ I, II, III, V und XI. Diese machen mengenmäßig die größte Gruppe an Kollagenen aus. Sie bilden lange Fibrillen, die durch versetztes Aneinanderlagern der Superhelices entstehen. Fibrillen-assoziierte Kollagene bilden dagegen selbst keine Fibrillen aus, sondern binden an die fibrillären Kollagene und modifizieren sie auf diese Weise. Das am häufigsten vorkommende Kollagen ist Kollagen Typ I. Es findet sich u. a. in der Haut, in Faszien, in Sehnen und Knochen [101]. Das häufigste Kollagen im hyalinen Knorpel ist Kollagen Typ II [19]. Weitere Kollagentypen, die im hyalinen Knorpel vorzufinden sind, sind Kollagen Typ I, III, VI, V, IX, X, XI, XII, XIV. Diese dienen u. a. der Verankerung von Kollagenfasern und Chondrozyten in der EZM [19, 28, 55]. Durch die Kollagenfasern erhält die Knorpelmatrix ihre Stabilität und im Zusammenspiel mit den anderen Komponenten der EZM, insbesondere Aggrecan, ihre prallelastische Konsistenz [19].

### 1.2.2 Gelenkkapsel und Synovia

Die Gelenkkapsel begrenzt das Gelenk nach außen und schließt die Gelenkhöhle vollständig luftdicht ab. Sie wird unterteilt in die äußere Membrana fibrosa, eine straffe Bindegewebsschicht, die vor allem aus Kollagen Typ I besteht, sowie einer inneren Bindegewebsschicht, der Membrana synovialis, auch Synovialmembran genannt [92]. Letztere kann bisweilen in Falten vorliegen (Plicae synoviales) oder fingerförmig ausgestülpt sein (Villi synoviales) [20]. Die Membrana synovialis kann wiederum unterteilt werden in das subintimale Gewebe und die synoviale Intima [92]. Das subintimale Gewebe verbindet die Membrana fibrosa mit der synovialen Intima und besteht aus locke-

rem bis straffem Bindegewebe. Dieses enthält zahlreiche Kapillaren mit fenestriertem Endothel sowie reichlich Lymphgefäße [20]. Zusätzlich finden sich in der Subintima Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen und Adipozyten [92]. Afferente Nervenfasern wie Mechano- und Nozizeptoren liegen in der Membrana fibrosa und in der Subintima [20]. Die synoviale Intima besteht aus Synoviozyten, die eine 1- bis 4-lagige, diskontinuierliche Deckschicht bilden [20, 118].

### Synovialozyten

Synovialozyten sind Zellen mesenchymaler Herkunft und werden daher als modifizierte Bindegewebszellen angesehen [92]. Sie können unterteilt werden in Typ-A- und Typ-B-Synovialozyten [92]. Im menschlichen Kniegelenk beträgt das Verhältnis von Typ-A und Typ-B Synovialozyten ca. 2 : 1 [20]. Die Grenzschicht der Synovialmembran zur Gelenkhöhle besteht vor allem aus Typ-A-Synovialozyten. Die Typ-B-Synovialozyten liegen zumeist unter den Typ-A-Synovialozyten, jedoch reichen ihre Fortsätze oder Somata häufig an das Lumen der Gelenkhöhle heran [20, 37]. Bei den Typ-A-Synovialozyten handelt es sich um aus dem Knochenmark stammende, makrophagenähnliche Fibroblasten, die vor allem an der Oberfläche liegen und anfallende Abbauprodukte und Bakterien durch Phagozytose aus der Gelenkhöhle entfernen [20, 37, 92]. Sie sind zur Antigenpräsentation befähigt und stehen zum Teil über Nexus und Adhärenzpunkte miteinander in Verbindung [20, 37]. Die Typ-B-Synovialozyten, auch synoviale Fibroblasten genannt (engl. fibroblast-like synoviocytes, FLS), sind spezialisierte Fibroblasten. Sie besitzen eine rundliche bis ovale Form und ein stark entwickeltes endoplasmatisches Retikulum zur Synthese von EZM-Bestandteilen [20]. FLS produzieren den Großteil der Hyaluronsäure in der Synovialflüssigkeit sowie Proteine, beispielsweise Kollagene, Glykoproteine wie Fibronektin und Proteoglykane, wie z.B. Lubricin [20, 37, 55]. Darüber hinaus weisen neuere Forschungsergebnisse darauf hin, dass sich in der Synovialmembran auch mesenchymale Stammzellen finden, die in der Lage sind, sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren und so zur Regeneration und Reparatur von verletztem Gelenkgewebe beitragen könnten [88].



### Synovia

Die Synovia ist eine klare, gelblich tingierte, fadenziehende Flüssigkeit mit visköser Konsistenz, die mit einem Volumen von bis zu 3 ml die Gelenkhöhle ausfüllt [20; 92]. Als Dialysat des Blutes stammen die meisten Proteine sowie weitere kleine Moleküle (z. B. Glukose und Urea) als auch Elektrolyte aus dem Plasma und liegen in ähnlichen Konzentrationen vor [20, 37]. Außerdem finden sich in der Synovia beträchtliche Mengen an Hyaluronsäure, die für die viskösen Eigenschaften der Synovia verantwortlich ist und verschiedene Glykoproteine und Proteoglykane der EZM, die vor allem von FLS produziert werden [20, 37]. Zusätzlich finden sich in der gesunden Synovia pro Mikroliter etwa 100 freie Zellen, bei denen es sich vorwiegend um Synovialozyten und Leukozyten handelt [20]. Die Synovialflüssigkeit dient der Ernährung - insbesondere des Gelenkknorpels und weiteren im Gelenk gelegenen Strukturen [92]. Als natürliches Schmiermittel setzt sie zudem die Reibung der beiden artikulierenden Gelenkflächen herab und dient ferner als Stoßdämpfer [20, 55, 88, 92].

## **1.3 Arthrose**

Die Arthrose (engl. osteoarthritis, OA) ist die am häufigsten vorkommende Gelenkerkrankung. Sie wird begleitet von fortschreitenden Veränderungen des Knorpels, des subchondralen Knochens, der Synovialmembran, der Capsula fibrosa und der periartikulären Muskulatur [6, 108]. Während der im deutschen Sprachraum verwendete Begriff Arthrose vor allem die degenerative Komponente des Krankheitsbildes beschreibt, weist die englische Bezeichnung *osteoarthritis* auf die entzündliche Komponente der Erkrankung hin [71]. Die OA betrifft über 15 % der gesamten [42] und über 60 % der älteren Population [108]; Frauen sind etwas häufiger betroffen als Männer [108].

Die häufiger vorkommende primäre Form der OA verläuft oft oligoartikulär und ohne äußerlich erkennbare Ursache [54, 108]. Sie manifestiert sich vorwiegend an lasttragenden Gelenken wie der Hüfte oder dem Knie [56], findet sich jedoch auch an der Halswirbelsäule sowie an bestimmten Gelenken der Hände und Füße [108]. Klinisch lassen sich ein stummes bzw. latentes, ein aktiviertes und ein dekompenziertes Stadium unterscheiden [7]. Symptome, die mit der OA einhergehen, sind Schmerzen, Schwellung, Steifigkeit, Verspannung der Muskulatur, zunehmende Bewegungseinschränkung und schließlich die Deformierung des Gelenks [12, 54, 71].

Typische röntgenmorphologische Kennzeichen sind zunehmende Gelenkspaltverschmälerung durch Höhenabnahme des Gelenkknorpels sowie die Spaltbildung desselben. Außerdem zeigen sich subchondrale Sklerosierungen, die Entstehung von sogenannten Geröllzysten im subchondralen Knochen sowie exo- und osteophytäre Anbauten [71]. Klinik- und röntgenmorphologische Befunde der OA können sich jedoch deutlich unterscheiden [71]. Das wichtigste bildgebende Verfahren in der OA-Forschung stellt heutzutage die Magnetresonanztomographie dar. Aufgrund der hohen Kosten wird dieses derzeit jedoch nicht routinemäßig eingesetzt [31]. Der Einsatz von Biomarkern zur Verlaufs- und Therapiekontrolle der OA ist derzeit Gegenstand wissenschaftlicher Forschung [35, 79].

### 1.3.1 Ätiologie

Die OA lässt sich in eine primäre und eine sekundäre Form unterteilen [54, 71]. Frühere Annahmen, die OA sei eine rein degenerative Erkrankung des Gelenkknorpels, die durch Verschleiß und mechanische Belastung entstände, sind heute nicht mehr haltbar [12, 108]. Wahrscheinlicher ist, dass die OA die Endstrecke eines komplizierten Zusammenspiels verschiedener pathophysiologischer Prozesse darstellt, die durch mechanische, zelluläre und biochemische Faktoren verursacht werden und die schließlich in ihrer Summe zum Krankheitsbild führen und als solches das gesamte Gelenk betreffen [2, 42, 100, 108].

Bei der häufiger vorkommenden primären, auch als idiopathisch bezeichneten Form der Erkrankung handelt es sich um eine bislang noch nicht gänzlich verstandene, wohl durch biochemische und metabolische Veränderungen bedingte Minderwertigkeit des Gelenkknorpels [71, 108]. Eine besondere Bedeutung muss der genetischen Komponente der OA beigemessen werden. In den vergangenen Jahren konnten einige Gene, wie beispielsweise der growth-differentiation-factor-5 und die Deiodinase-Iodothyronine-Typ 2, identifiziert werden, die das Risiko an einer OA zu erkranken erhöhen [42, 54, 108]. Bekannt ist mittlerweile auch, dass verschiedene Unterformen der OA mit unterschiedlichen genetischen Veränderungen einhergehen [108]. So ist ein Abschnitt auf Chromosom 11q mit Coxarthrose bei Frauen und ein Abschnitt auf Chromosom 7q22 mit dem Auftreten von Gonarthrose assoziiert [42]. Weitere starke Prädiktoren für die OA sind außerdem Alter und Übergewicht, auch wenn die genauen Zusammenhänge

noch nicht gänzlich verstanden werden [42, 51, 79, 108]. So weisen Ergebnisse aktueller Forschung darauf hin, dass Adipositas nicht nur durch eine erhöhte mechanische Belastung der Gelenke, sondern möglicherweise auch durch zusätzliche, vor allem aus dem weißen Fettgewebe stammenden entzündungsfördernden metabolischen Faktoren, den Adipokinen, die Entstehung einer OA begünstigt [79].

Als sekundäre OA bezeichnet man die Manifestation einer OA, deren Ursache bekannt ist [71]. Hierzu werden arthrotische Gelenkveränderungen gezählt, denen Systemerkrankungen wie metabolische und endokrine Krankheiten oder lokale Schädigungen wie Überlastung, Verletzungen oder Gelenkentzündungen zugrunde liegen [71, 108].

### **1.3.2 Pathogenese**

Die Pathogenese der OA ist durch die zunehmende Zerstörung und den schließlich gänzlichen Verlust des hyalinen Gelenkknorpels mit Freiliegen des darunter liegenden subchondralen Knochens gekennzeichnet [2, 108]. Als Gelenkerkrankung betrifft die OA nicht nur den Gelenkknorpel, sondern affiziert das gesamte Gelenk und als Systemerkrankung möglicherweise auch den gesamten Organismus [12, 52, 57, 58, 108]. Hierbei scheint es sich um ein komplexes entzündliches Geschehen zu handeln, in dem vor allem von Gelenkknorpel, subchondralen Knochen und Synovium sezernierte Entzündungsmediatoren eine wichtige Rolle spielen [12]. Möglich ist darüber hinaus jedoch auch, dass die OA durch eine leichtgradige chronische Systementzündung gefördert oder sogar ausgelöst wird [12].

Die Zerstörung des Gelenkknorpels ist Folge eines metabolischen Ungleichgewichts, welches einerseits auf dem vermehrten Abbau des Knorpels und andererseits auf mangelnden Reparaturmechanismen beruht [2, 58]. Wodurch dieses Ungleichgewicht initial hervorgerufen wird, ist derzeit nicht bekannt, und es bleibt unklar, ob Veränderungen im subchondralen Knorpel oder in der Synovialmembran dem arthrotischen Krankheitsgeschehen im hyalinen Gelenkknorpel vorausgehen oder ob sie selbst lediglich die Folge von Veränderungen des Gelenkknorpels darstellen [58].

Ob durch Traumen oder entzündliche Prozesse hervorgerufen - es kommt vermutlich zur Stimulation von Chondrozyten, die in der Folge vermehrt degradierende Enzyme freisetzen [58]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Kollagenfragmente in der Lage sind, die Expression und Aktivierung von verschiedenen Matrix-

Metalloproteinasen zu beeinflussen [23]. Kommt es dadurch zu einem Anstieg von Abbauprodukten der Knorpelmatrix, werden diese auch von synovialen Makrophagen phagozytiert. Die Makrophagen werden dadurch aktiviert und antworten mit der Freisetzung von Zytokinen und Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin (IL)-1 und IL-6 [58]. Durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen werden wiederum Chondrozyten weiter stimuliert und beginnen ebenfalls mit der Produktion von proinflammatorischen Botenstoffen [108]. Insbesondere IL-1 und TNF- $\alpha$  scheinen dabei im OA-Prozess eine zentrale Rolle zu spielen [14, 108, 118].

Ferner ist an der Entzündungsreaktion vermutlich auch das angeborene Immunsystem beteiligt, z. B. durch Aktivierung von sogenannten pattern-recognition-Rezeptoren (PRRs) wie den toll-like-Rezeptoren (TLRs) [100]. PPRs können u. a. durch endogene „Gefahrssignale“, sogenannten damage/danger-associated-molecular-patterns, aktiviert werden. Im osteoarthritischen Gelenk findet sich eine Vielzahl an möglichen Liganden, die die Aktivierung von TLRs auslösen können. Die TLRs aktivieren das Immunsystem und induzieren ebenfalls die Freisetzung entzündungsfördernder Signalwege [88; 100].

In Folge dieser Entzündungsreaktionen kommt es zur vermehrten Produktion und Freisetzung verschiedener Metalloproteinasen, wie beispielsweise den Aggrecanasen, die zur der Gruppe der A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs (ADAMTS) gezählt werden, und zu den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zählende Kollagenasen, die in der Lage sind, Kollagenfibrillen zu spalten und so die EZM des Knorpels zerstören, siehe auch Kapitel 1.3.4.4 [108].

Von einigen Entzündungsmediatoren wie IL-1, TNF- $\alpha$  und NO ist außerdem bekannt, dass sie eine Apoptose-induzierende Wirkung besitzen, einem weiteren wesentlichen Merkmal der OA, das über vielfältige Signalwege ausgelöst wird [27, 108]. Darüber hinaus fördern die sezernierten Entzündungsmediatoren den Verlust von Knorpelmasse, indem sie die Synthese der EZM, beispielsweise die Produktion von Kollagen Typ II, inhibieren [50, 58]. Ferner kommt es zu Störungen in den Regelkreisen von Wachstumsfaktoren wie dem Insuline-like growth factor IGF-1 und IGF-2, die nicht nur Chondrozyten, sondern auch die Entwicklung und Funktion von Osteoblasten beeinflussen [108].

Zunächst versucht der Gelenkknorpel die Funktionsfähigkeit der EZM mithilfe von verschiedenen Kompensationsmechanismen aufrecht zu erhalten [58]. Diejenigen Chondrozyten, die nicht apoptotisch werden, proliferieren und bilden Chondrozytencluster

[108]. Durch die vermehrte Synthese von Matrixbestandteilen, wie Kollagenen, Proteoglykanen und Hyaluronsäure [58], kann so eine OA über Jahre hinweg kompensiert und klinisch still verlaufen [58, 108]. Wohl auch infolge der chronischen Entzündung und des veränderten Milieus kommt es jedoch im Verlauf der Erkrankung zur Änderung des Phänotyps der Chondrozyten hin zu hypertrophen Zellen [50, 56]. Die hypertrophen Chondrozyten und im Verlauf einwandernde mesenchymale Stammzellen sind schließlich nicht mehr in der Lage, eine gesunde Knorpelmatrix zu produzieren [56, 108]. Es resultiert eine minderwertige, nichtchondrozytäre EZM mit veränderten biomechanischen Eigenschaften, die zusammen mit der entzündlichen, fortschreitenden Degradation der Knorpelmatrix den weiteren Progress der Erkrankung fördert [56]. Schließlich kann es so zum kompletten Verlust des Gelenkknorpels und dem Freiliegen des darunterliegenden geschädigten subchondralen Knochens kommen [58, 108].

### **1.3.3 Die Rolle der synovialen Inflammation**

Die Entzündung der Synovialmembran (Synovitis) spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der OA [12]. Sie kann oft schon in frühen OA-Stadien nachgewiesen werden [2, 10] und ist in diesen zudem häufig am stärksten ausgeprägt [10, 52]. Die osteoarthritische Synovitis ist oft regional begrenzt und kann bisweilen asymptomatisch verlaufen [2]; oftmals ist sie aber für einen großen Teil der klinischen Beschwerden mitverantwortlich wie Schmerzen, Rötung, dem Anschwellen der Gelenke, Ergüssen und zunehmender Steifigkeit [12, 52, 77, 118].

Histopathologische Kennzeichen der Synovitis sind Verdickung durch synoviale Hypertrophie sowie villöse oder Deckzellschichthyperplasie [52, 58, 77, 88, 118]. Zusätzlich kann es zur Infiltration von Entzündungszellen wie Makrophagen und Lymphozyten kommen [52, 58]. In fortgeschrittenen OA-Stadien finden sich zudem Fibrosierungen der Kapselwand sowie kartilaginärer und ossärer Detritus [52, 118]. Eine verstärkte Vaskularisation wird ebenfalls häufig beschrieben und mit der vermehrten Bildung von Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) und basic fibroblast growth factor in Zusammenhang gebracht [58; 118].

Wodurch die Synovitis ausgelöst wird, bleibt bislang ungeklärt [52, 58]. Eine gängige Hypothese ist, dass die Synovitis in der OA erst sekundär entsteht. So könnte die synoviale Inflammation durch Knorpel- oder Knochenfragmente, Mikrokristalle und abnor-

me mechanische Belastung induziert werden [58, 88]. Silverstein et al. [98] konnten in jüngster Vergangenheit an kultivierten bovinen FLS zeigen, dass kleine Knorpelpartikel im Zellkulturversuch allein ausreichen, um eine Synovitis zu induzieren: In den Untersuchungen stimulierten Knorpelfragmente die FLS, indem diese entweder an die Oberfläche von Synovialozyten banden oder von diesen phagozytiert wurden. FLS, die mit Knorpelpartikeln inkubiert wurden, begannen zu proliferieren und setzten vermehrt Entzündungsmediatoren wie NO und PGE<sub>2</sub> frei [98]. Andere Theorien sehen in dem synovialen Gewebe einen primären Trigger des OA-Krankheitsprozesses [12].

Kommt es schließlich zur Freisetzung von proinflammatorischen Botenstoffen aus dem Synovium, diffundieren diese auch in den Knorpel und befeuern dort die Knorpeldegradation – was in Folge wiederum die Entzündungsreaktion weiter fördert [58].

Auf molekularer Ebene dürfte es verschiedene Mechanismen geben, die die Entstehung und das Fortschreiten einer Synovitis begünstigen [88]: Eine wichtige Rolle spielt vermutlich der Nuclear-Factor-„ $\kappa$ -light-chain-enhancer-of-activated-B-cells“ (NF- $\kappa$ B)-Signalweg, der für die Produktion einer Vielzahl von proinflammatorischen Signalstoffen wie Zytokinen, Chemokinen und verschiedenen MMPs verantwortlich ist [88]. Dieser kann durch Matrixfragmente-aktivierte TLR induziert werden [88] und zur vermehrten Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen führen [88]. Darüber hinaus könnte eine Synovitis auch durch Aktivierung der Komplementkaskade beispielsweise durch frei werdendes Fibromodulin, Cartilage-Oligomeric-Matrix-Protein (COMP) und Osteoadherin induziert bzw. vorangetrieben werden [88].

Durch Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zyto- und Chemokinen sowie proteolytischen Enzymen beeinflussen aktivierte Synoviozyten und in die Synovialmembran eingewanderte Immunzellen den OA-Prozess im Gelenk und fördern die Degradation des Knorpels [2; 58; 88]. So konnte die Freisetzung von verschiedenen proinflammatorisch wirkenden Botenstoffen, wie unter anderem IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , Prostaglandinen und NO, sowie die Produktion von katabolen Enzymen wie MMP-1, -3, -9- und -13 aus osteoarthritischem, synovialen Gewebe nachgewiesen werden [14, 49, 58, 61, 88]. Ebenfalls beschrieben wurde jedoch auch die vermehrte Freisetzung von protektiv wirkenden Enzymen wie beispielsweise den Tissue-Inhibitor-of-Metalloproteinasen (TIMP) -1 und -3 [106].

### 1.3.4 Zytokine, Chemokine, Entzündungsmediatoren und Enzyme

Im Folgenden soll auf die in dieser Arbeit untersuchten proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie auf das Chemokin IL-8 und die Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub> und NO näher eingegangen werden. Ferner soll die Familie der MMPs, insbesondere MMP-1, -3 und -13, und die Familie der TIMPs, insbesondere TIMP-3, charakterisiert werden.

#### 1.3.4.1 Proinflammatorische Zytokine

##### Interleukin-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  spielt eine wichtige Rolle im Krankheitsgeschehen der OA [108, 118]. Im arthrotischen Gelenk wird IL-1 unter anderem von Synoviozyten [58] und Chondrozyten synthetisiert und freigesetzt [108]. Durchschnittlich finden sich in der Synovialflüssigkeit von osteoarthritischen Gelenken IL-1 $\beta$ -Spiegel von  $8 \pm 16$  pg/ml ( $\bar{x} \pm SD$ ; vgl. gesunde Gelenke:  $1 \pm 2$  pg/ml) [112]. Studien zeigen, dass Hydroxylapatit- und Kalziumphosphatkristalle, wie sie auch in arthrotischen Gelenken zu finden sind, die Inflammasom-vermittelte IL-1-Produktion fördern [88]. In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  in der Lage ist, Knorpeldestruktion zu induzieren [88]. Dies geschieht zum einen durch Inhibition der chondrozytären Kollagen- und Aggrecanynthese sowie durch vermehrte Expression von proteolytischen Enzymen wie ADAMTS-4 und -5 und MMP-1, -3 und -13 [62, 88, 93]. IL-1 $\beta$  induziert ferner seine eigene Expression und die von weiteren proinflammatorischen und Matrix-degradierenden Faktoren wie beispielsweise IL-6, Prostaglandin-Endoperoxide-Synthase-2, Nitric-Oxide-Synthase-2 (= induzierbare nitric-oxide-synthase, iNOS), TNF- $\alpha$  und dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B1 [14, 93]. Darüber hinaus erhöht IL-1 $\beta$  auch die Expression von Insulin-like-Growth-Factor-Binding-Protein-4 und TIMP-1 und -4 sowie das Vascular-cell-adhesion-protein-1 und VEGF [93]. Außerdem kann IL-1 die Apoptose von Chondrozyten induzieren [27]. In der Synovialmembran und der Synovia löst IL-1 $\beta$  Zellinfiltration aus [93].

### Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Auch TNF- $\alpha$  spielt eine zentrale Rolle im OA-Gelenk [108, 118] und wird unter anderem von Synoviozyten [58] und Chondrozyten freigesetzt [108]. Die TNF- $\alpha$ -Spiegel in der Synovialflüssigkeit betragen in osteoarthritischen Gelenken durchschnittlich  $4 \pm 20$  pg/ml ( $\bar{x} \pm SD$  vgl. gesunde Gelenke:  $0 \pm 0$  pg/ml;  $\bar{x} \pm SD$ ) [112].

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigt TNF- $\alpha$  ähnliche Effekte wie IL-1 [28]. So ist auch TNF- $\alpha$  in der Lage, Chondrozyten und Synoviozyten dahingehend zu aktivieren, verstärkt proinflammatorische Botenstoffe und Proteasen zu produzieren [14; 88] und kann außerdem die Apoptose von Chondrozyten induzieren [27]. Gemeinsam erzielen TNF- $\alpha$  und IL-1 dabei synergistische Effekte [28]. Möglicherweise reagiert der OA-Gelenkknorpel empfindlicher auf TNF- $\alpha$  als ein gesunder Gelenkknorpel. Darauf weisen die vermehrte Produktion von TNF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ -Konvertase-Enzym sowie eine vermehrte Expression der TNF- $\alpha$ -Rezeptoren p55 in Proben aus humanem arthrotischem Knorpel hin [118].

### Interleukin-6

IL-6 ist ein Zytokin mit pleiotroper Wirkung [68], das eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion spielt [78] und dem vor allem regulatorische Funktionen zugesprochen werden [28, 41, 78]. Erhöhte Konzentrationen von IL-6 finden sich sowohl in der Synovia (OA:  $396 \pm 508$  pg/ml; gesund:  $64 \pm 120$  pg/ml;  $\bar{x} \pm SD$  [112]) als auch im Serum (OA:  $862 \pm 3830$  pg/ml; gesund:  $91,5 \pm 68,8$  pg/ml;  $\bar{x} \pm SD$  [44]) von Patienten mit arthrotischen Gelenkerkrankungen [68]. Ferner soll IL-6 auch an der Schmerzentscheidung im OA-Gelenk beteiligt sein [15; 49]. So werden beispielsweise erhöhte Serumspiegel des Zytokins mit Schmerzen in frühen Gonarthrose-Stadien in Verbindung gebracht [96].

Sowohl Chondrozyten als auch Synoviozyten und Osteoblasten sind in der Lage, IL-6 zu produzieren [24, 58, 103]. Die Expression von IL-6 wird unter anderem durch TNF- $\alpha$  und IL-1, PGE<sub>2</sub> und die Aktivierung von TLRs induziert [14, 28, 49, 88, 93]. Untersuchungen *in vitro* konnten belegen, dass IL-6 die Knorpelregeneration durch Inhibition der Proteoglykansynthese und Proliferation von Chondrozyten unterdrückt [41] und darüber hinaus die vermehrte Produktion von MMP-1, -3 und -13 in Chondrozyten und Synoviozyten fördert [41, 68]. Um die komplette Wirkung von IL-6 zu entfalten, ist der



lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R) erforderlich [25, 28]. So sollen IL-6 und sIL-6R gemeinsam katabole Effekte von TNF- $\alpha$ , IL-1 oder mechanischen Traumata potenzieren [25, 85, 107]. Der IL-6/sIL-6R-Komplex aktiviert außerdem das ubiquitär auf Zellen exprimierte Glykoprotein-130 (Gp130), welches die Signale von IL-6 nach intrazellulär weitervermittelt [43, 110]. Gp130 kann u.a. durch das lösliche Glykoprotein-130 kompetitiv inhibiert werden und stellt damit möglicherweise einen interessanten zukünftigen Therapieansatz dar [43, 110].

#### **1.3.4.2 Chemokine**

##### Interleukin-8

IL-8 wird zu den proinflammatorisch wirkenden Chemokinen gezählt [109]. Im arthrotischen Gelenk wird IL-8 vor allem eine regulatorische Funktion beigemessen, indem es etwa die Wirkung von IL-1 und TNF- $\alpha$  beeinflusst [28]. Es wird in der OA von Chondrozyten [109] und Synoviozyten und Osteoblasten produziert [14, 87, 88]. Die Freisetzung von IL-8 wird mit IL-1 und TNF- $\alpha$  in Verbindung gebracht [14], jedoch sollen auch aktivierte TLRs in der Lage sein, die vermehrte Produktion von IL-8 zu induzieren [88]. Das Chemokin soll zur Einwanderung von Leukozyten, insbesondere von Neutrophilen, in das Synovium führen und die Freisetzung von MMP-13 fördern. Auf Chondrozyten soll IL-8 ferner einen hypertrophierenden und differenzierenden Effekt ausüben und zu Hypertrophie und Zelldifferenzierung führen [109].

#### **1.3.4.3 Entzündungsmediatoren**

##### Prostaglandin E<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub> ist ein wichtiger Entzündungsmediator, der bei Patienten mit OA in erhöhten Konzentrationen in der Synovialmembran, Synovia und Gelenkknorpel zu finden ist [1; 49; 59]. Es handelt sich dabei um ein Arachidonsäurederivat [49], das vorwiegend von der Cyclooxygenase-2 (COX-2) produziert wird.

Initiiert wird die Synthese von PGE<sub>2</sub> durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  mittels Induktion der COX-2 [59]. Die Rolle von PGE<sub>2</sub> in der Pathogenese der OA ist komplex und scheint sowohl anabole als auch katabole Wirkungen aufzuweisen [49]: So wies niedrig dosiertes PGE<sub>2</sub> in Studien an humanen OA-Explantaten chondroprotektive Effekte auf und

soll in der Lage sein, die chondrozytäre Expression von MMP-1 zu verringern [49]. Weiter soll PGE<sub>2</sub> auch in der Lage sein, IL-1 $\beta$ -vermittelten Prozesse wie den Proteoglykanabbau in humanen oder bovinen Knorpelimplantaten sowie die Expression von Kollagenasen und Stromelysin in synovialen Fibroblasten aufzuheben [1, 59]. Im Gegensatz dazu legen jedoch andere Studien den Schluss nahe, dass PGE<sub>2</sub> vor allem katabole Reaktionen hervorruft, die das empfindliche Gleichgewicht im Knorpel stören [8, 49]: So soll PGE<sub>2</sub> im Entzündungsstadium die Knorpeldegradation fördern, indem es unter anderem die Zellproliferation verringert. Außerdem führte PGE<sub>2</sub> in Untersuchungen an humanen arthrotischen Knorpelzellen zu einer Verminderung der Proteoglykansynthese [8, 49]. Ob PGE<sub>2</sub> auch zu einer vermehrten Freisetzung von MMPs und ADAMTs führt oder seine katabole Wirkung im Proteoglykanstoffwechsel vor allem durch Inhibition der Aggrecan-Biosynthese entfaltet, wird von verschiedenen Studien unterschiedlich beantwortet [8, 49].

Die Effekte von PGE<sub>2</sub> im adulten Gelenkknorpel werden vermutlich vor allem durch Bindung an die PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren-2 und -4 (EP2 und -4) erzielt [49]. Interessanterweise werden diese Rezeptoren an einigen Gelenken, beispielsweise dem Kniegelenk, stärker exprimiert als an anderen. Dies könnte einen möglichen Grund darstellen, weswegen manche Gelenke häufiger von OA betroffen sind als andere [49]. Indem PGE<sub>2</sub> EP-2- und -4-vermittelt die Expression von IL-6 und iNOS erhöht, könnte PGE<sub>2</sub> außerdem an der Schmerzentstehung von OA-Patienten beteiligt sein [49].

### Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) und dessen Redoxderivate sind weitere wichtige Entzündungsmediatoren im OA-Gelenk, denen sowohl entzündungsfördernde als auch regulierende Wirkungen zugeschrieben werden [115, 1]. Unter *ex vivo*-Bedingungen zeigt der gesunde Knorpel keine spontane Freisetzung von NO, während dies im arthrotischen Knorpel der Fall ist [1]. NO wird in entzündlich veränderten Geweben, so auch im arthrotischen Gelenkknorpel [1], vorwiegend durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) synthetisiert, die eine von insgesamt drei Isoformen der NO-Synthase darstellt [115]. Eine vermehrte Expression von iNOS konnte im OA-Gelenk sowohl im Gelenkknorpel als auch im Synovium nachgewiesen werden. Das meiste NO in osteoarthritischen Gelenken wird jedoch vermutlich im Gelenkknorpel selbst produziert [115], und

hier sind es vor allem Chondrozyten aus der oberflächigen Knorpelzone, die die iNOS exprimieren [1]. Induziert wird die Produktion von iNOS sowohl durch mechanische Reize als auch durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  [1]. Interessanterweise wird der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B durch NO und seine Redoxderivate reguliert, gleichzeitig ist dieser jedoch auch für die Transkription der iNOS-Gene notwendig [1].

NO vermittelt die Expression und die Wirkung einer Vielzahl von proinflammatorischen Botenstoffen [1]. Ferner soll NO in der Lage sein, MMPs zu aktivieren, zu einer Verminderung der Kollagen- und Proteoglykansynthese führen und gilt nicht zuletzt als ein wichtiger Induktor von chondrozytärer Apoptose [1, 56, 115]. Eine vermehrte Expression der iNOS wird außerdem mit der Entstehung von Schmerzen bei Gonarthrose in Verbindung gebracht [49].

#### **1.3.4.4 Enzymfamilien**

##### Matrix-Metalloproteinasen(-1, -3, -13)

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) werden zu den Proteasen gezählt. Sie stellen eine Enzymgruppe dar, die maßgeblich an der Regulation und Degradation der EZM beteiligt ist [32, 38]. Beim Menschen sind 23 verschiedene MMPs bekannt [38]. Während ihre Expression im gesunden Knorpel relativ gering ist und vor allem zum normalen Umbau des Knorpels beitragen dürfte, führt eine übermäßige Expression zur Zerstörung des Gewebes [32]. Alle bekannten MMPs tragen ein zentrales Zinkatom in ihrem katalytischen Zentrum und benötigen Kalzium für ihre enzymatische Aktivität [32, 38]. Der überwiegende Anteil der MMPs wird als inaktive Pro-Form (proMMP) nach extrazellulär sezerniert [32, 38, 46]. Die extrazelluläre Aktivierung der Pro-Formen wird dann mittels proteolytischer Spaltung durch andere MMPs oder durch Serinproteasen wie beispielsweise Plasmin vollzogen [32, 38]. Ein kleinerer Anteil an MMPs wird bereits intrazellulär aktiviert [32, 38, 46].

Die übermäßige Freisetzung von MMPs in Geweben wird insbesondere auf IL-1 und TNF- $\alpha$ -induzierte Transkriptionsfaktoren zurückgeführt: So führen unter anderem der Activator-Protein-1- oder NF- $\kappa$ B-Signalweg zu einer vermehrten Expression von MMPs [32, 38]. Ferner weisen Studien darauf hin, dass auch weitere Zytokine wie bei-

spielsweise IL-6, IL-8 oder degradiertes Kollagen die Expression und Aktivierung von verschiedenen MMPs beeinflussen können [23, 63, 109].

In der Pathogenese der OA sind MMP-1 und MMP-13, auch Kollagenase-1 und -2 genannt, von besonderer Bedeutung [32, 46]. Diese können nämlich gemeinsam mit der sogenannten Neutrophilen Kollagenase, MMP-8, die Tripelhelix von fibrillären Kollagenen aufspalten und entspiralisieren [32, 46]. Insbesondere MMP-13 scheint eine wichtige Rolle zu spielen, weil sie den im hyalinen Gelenkknorpel vorwiegend vorliegenden Kollagen Typ II effektiver hydrolysiert als die anderen Kollagenasen. Im gesunden Knorpel wird MMP-13 nur während der Entwicklung produziert [32]. In der Folge hinterlassen Kollagenasen denaturiertes Kollagen (= Gelatine), das dann von weiteren MMPs, den Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, abgebaut werden kann [32, 46].

MMP-3, die auch Stomelysin-1 genannt wird, unterscheidet sich von den Kollagenasen unter anderem dadurch, dass sie nicht in der Lage ist, Kollagen Typ I abzubauen. Jedoch spaltet sie viele andere Substrate wie Fibronektin, denaturiertes Kollagen, Laminin sowie Proteoglykane und aktiviert andere MMPs wie die Gelatinasen und die Kollagenase MMP-13 [46].

Darüber hinaus scheinen einige MMPs, darunter auch MMP-1 und MMP-3, in der Lage zu sein, proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und Chemokine zu aktivieren und so auf die Entzündungsreaktion Einfluss zu nehmen [38, 46]. Wahrscheinlich ist die Funktion von MMPs *in vivo* tatsächlich noch deutlich komplexer als bisher angenommen: So sollen MMPs auch eine wichtige Funktion für das Zellverhalten und Homöostase besitzen, indem sie mittels proteolytischer Spaltung eine Vielzahl von Signalwegen regulieren [84].

### TIMP(-3)

Tissue-inhibitor-of-metalloproteinases (TIMPs) sind die bedeutendsten Inhibitoren der MMPs [9]. Bei Säugetieren konnten bislang vier verschiedene TIMPs (TIMP 1-4) beschrieben werden [9]. Alle TIMPs weisen viele Gemeinsamkeiten auf und sind in der Lage, alle bislang untersuchten MMPs zu deaktivieren. Dennoch unterscheiden sie sich in einigen strukturellen und biochemischen Punkten, was vermuten lässt, dass sie im Organismus verschiedene Funktionen besitzen [9]. Für die OA-Forschung scheint ins-

besondere TIMP-3 von großem Interesse zu sein, da TIMP-3 auch die Aggrecanasen 1 und 2 (ADAMTS4 und ADAMTS5) sowie ADAM12 und -17 inhibieren kann [9].

Im osteoarthritischen Geschehen ist das Verhältnis von MMP und TIMP gestört. So findet sich im OA-Knorpel ein deutlich stärkerer Anstieg an MMP als von TIMP [18]. Im Tierversuch an TIMP-3-Knockout-Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass ein Mangel an TIMP-3 zu ähnlichen Veränderungen am Knorpel führt, wie sie auch bei Patienten mit OA beobachtet werden [86]. Außerdem scheint die Fähigkeit von TIMP, MMP im arthrotischen Knorpel inaktivieren zu können, vermindert und nur wenig wirksam zu sein, selbst wenn diese von exogen zugeführt werden [63].

### 1.3.5 Therapie

Die OA ist trotz intensiver Bemühungen nach heutigem Stand der Forschung nicht kurativ behandelbar [34, 64]. Die Ziele der modernen OA-Therapie bestehen daher vor allem in dem Erreichen von Schmerzfreiheit, der Reduktion von Entzündungen, einer Verbesserung der (Gelenk-) Funktion und der Verzögerung des OA-Progresses [7]. Man unterscheidet grob zwischen nichtmedikamentösen, medikamentösen und chirurgischen Maßnahmen [7]. Zu den nichtmedikamentösen Therapieoptionen zählen unter anderem Allgemeinmaßnahmen wie Gewichtsreduktion, die Nutzung von Gehhilfen, physikalische Therapie und Physiotherapie [7]. In der medikamentösen Therapie kommen nicht-opioide-Analgetika, Nicht-Steroidale-Antirheumatika (NSAR), Opioidanalgetika, die intraartikuläre Injektion von Glukokortikoiden, Externa sowie weitere Wirkstoffe wie die sogenannten Slow-Acting-Drugs-in-OA (SADOA) zum Einsatz. Letztere können noch einmal unterteilt werden in Symptomatic-Slow-Acting-Drugs-in-OA (SYS-ADOAs) und Disease-Modifying-OA-Drugs (DMOADs) [7, 104]. In der chirurgischen Therapie werden gelenkerhaltende Maßnahmen wie Osteotomien, Gelenklavagen – und Debridements, Knochenanbohrungen, Arthroplastiken, Mosaikplastiken und Mikrofrakturierungen von gelenkersetzenden Maßnahmen wie der Implantation künstlicher Gelenke bzw. gelenkversteifende Maßnahmen (Arthrodesen) unterschieden [7].

Die bedauerliche Tatsache, dass die OA bis heute weder kurativ behandelbar ist noch Behandlungsmethoden zur Verlangsamung des Krankheitsverlaufs bekannt sind [48] und sich Patienten zudem eine möglichst nebenwirkungsfreie Therapie wünschen, führte in den vergangenen Jahren dazu, dass sich alternative medizinische Therapieoptionen

bei OA-Patienten immer größerer Beliebtheit erfreuten. Etwa 47 % aller Patienten mit OA nutzen alternative oder additive medizinische Therapieangebote, darunter auch Nahrungsergänzungsmittel [48]. In den vergangenen Jahren gerieten Nahrungsergänzungsmittel, die zur Prävention und Behandlung von OA eingesetzt werden, vermehrt in den Fokus der Öffentlichkeit und wurden zum Gegenstand wissenschaftlicher Forschung [34, 53]. Besondere Aufmerksamkeit wurde hierbei den KH zuteil, nachdem Oesser et al. [73] die Ergebnisse einer *in vitro*-Studie veröffentlichten, die den Schluss zuließ, KH könnten degenerative Schäden der Knorpelmatrix reduzieren.

### 1.3.6 Wirkung von Kollagenhydrolysaten

KH werden in der Regel vom Gastrointestinaltrakt (GIT) problemlos verdaut und resorbiert [34]. In den meisten Untersuchungen wurden KH mit Wasser verabreicht [34], jedoch finden sich Hinweise dafür, dass KH in fermentierter Milch besser resorbiert werden [116].

Im Mausmodell konnten Oesser et al. [72] mithilfe von  $^{14}\text{C}$ -markierten KH zeigen, dass etwa 90 % der verabreichten KH in einem Zeitraum von sechs Stunden aus dem GIT resorbiert werden. Im Vergleich zu isoliertem  $^{14}\text{C}$ -markiertem Prolin konnte bei Gabe von markierten KH innerhalb der ersten 96 Stunden nach Aufnahme eine doppelt so hohe Radioaktivität im Knorpel gemessen werden, woraus gefolgert wurde, dass sich KH vorzugsweise im Knorpel ansammeln. In derselben Studie wurde außerdem von Messergebnissen berichtet, die den Schluss nahelegen, dass KH im GIT nicht ausschließlich in Aminosäuren aufgespalten werden, sondern in bestimmten Mengen auch in Form von kleineren Peptiden resorbiert werden [72]. Diese Vermutung wurde in weiteren Tierversuchen an Ratten von Wang et al. [117] bestätigt, in denen ca. 63 % des verabreichten Kollagens in Form von Peptiden aus dem Intestinum resorbiert wurde.

Gemäß Herstellerangaben wird eine tägliche Einnahme von 10 g KH empfohlen, sodass die KH-Plasmaspiegel im menschlichen Organismus, auch wenn diese in kurzer Zeit eingenommen und vollständig absorbiert werden, vermutlich weniger als 1 bis 2 mg/ml betragen [90]. Iwai et al. [36] identifizierten im Serum einer kleinen Gruppe von gesunden Probanden nach dem Verzehr verschiedener KH-Präparate, die aus Kollagen Typ I und Typ II von Hühnern (Nippon Meat Packers, Osaka, Japan) oder Schweinen (SCP-5000, Nitta Gelatin, Osaka, Japan) hergestellt wurden, einen Anstieg von hydroxyprol-

inhalten Peptiden, insbesondere von Prolin-Hydroxyprolin (Pro-Hyp). Ohara et al. [75] zeigten in einer weiteren Studie, die ebenfalls nur an einer kleinen Probandenanzahl erfolgte, dass sich die Zusammensetzung und Konzentration der im Serum detektierten hydroxyprolinhaltigen Peptide nach Einnahme von verschiedenen aus Fisch oder Schwein hergestellten KH-Präparaten (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) unterschied. Das mit der höchsten Konzentration vorliegende Peptid war jedoch unabhängig von den verwendeten Präparaten stets Pro-Hyp [75]. Ein Anstieg des Pro-Hyp-Serumgehalts konnte auch bei Meerschweinchen nach Verfütterung von KH beobachtet werden [74]. Darüber hinaus ist jedoch bislang nur wenig über die Plasmaspiegel und Vielfalt von präparatspezifischen KH-Peptiden *in vivo* bekannt [90, 95, 117].

Die zugrundeliegenden Wirkmechanismen von KH auf den Organismus konnten bislang nicht vollständig aufgeklärt werden. Ohara et al. [75] mutmaßten, basierend auf früheren Studien [45, 47, 76, 80, 81], in denen die biologische Aktivität von hydroxyprolinhaltigen Peptiden in verschiedenen Zellkulturen bereits beschrieben worden war, dass KH durch diese eine Wirkung auf den Organismus entfalten könnten und dass die biologische Aktivität verschiedener KH-Präparate möglicherweise von der verwendeten Spezies oder dem enthaltenen Kollagentyp abhängt. Auf molekularer Ebene könnten KH ihre Effekte auch durch Interaktion mit dem Integrinrezeptor hervorrufen. So konnten Siebert et al. [97] nachweisen, dass Kollagenfragmente sowohl in tripelhelikaler als auch in monomerer Form Wechselwirkungen mit der  $\alpha 2A$ -Domäne des Integrinrezeptors eingehen. Die Interaktion mit Kollagenfragmenten in tripelhelikaler Form und dem Integrinrezeptor war jedoch ungleich stärker als mit Kollagenfragmenten, die einzelsträngig vorlagen [97].

### 1.3.6.1 *In vitro*-Studien mit KH und anderen Kollagenderivaten

Kollagenfragmente, die eine Wirkung auf das Knorpelgewebe entfalten, können entweder endogen aus dem Knorpel selbst stammen (dann vorwiegend Kollagen Typ II) oder dem Gewebe von exogen, beispielsweise in Form von KH, zugeführt werden. Im Folgenden sollen einige erfolgte *in vitro*-Studien vorgestellt werden. Eine Übersicht findet sich in Tab. 1. Die Wirkung von endogenen Kollagenfragmenten wurde in mehreren *in vitro*-Studien untersucht: Jennings et al. [40] demonstrierten in Untersuchungen an bovinen und humanen Chondrozytenkulturen sowie an humanen Knorpelimplantaten, dass

bovine Kollagen Typ II-Fragmente eine dosisabhängig inhibierende Wirkung auf das Anhaftungsverhalten der Zellen an Kollagene und die Kollagensynthese besitzen und außerdem die Matrixdegradation induzieren können [40]. In einer anderen Studie von Fichter et al. [23] wurden bovine und humane Chondrozyten und Knorpelimplantate untersucht, mit dem Ziel mögliche Rückkopplungsmechanismen von Kollagen Typ-II-Fragmenten auf die mRNA- und Proteinexpression von verschiedenen MMPs zu analysieren. Fichter et al. konnten in dieser Studie nachweisen, dass Kollagenfragmente den Expressionsgrad und die Aktivität von verschiedenen MMPs wie MMP-2, -3, -9 und -13 beeinflussen [23]. Diese Wirkung könnte entweder aktiv die arthrotische Knorpeldestruktion fördern oder einfach einen endogenen Rückkopplungsmechanismus für den normalen Gewebeumbau darstellen [23, 40, 89].

Zur Wirkung von exogen zugeführten Kollagenderivaten wie KH finden sich in der Literatur nur wenige *in vitro*-Studien. Größere Aufmerksamkeit erlangte eine *in vitro*-Studie von Oesser et al. [73] aus dem Jahr 2003, in der berichtet wurde, dass bei ausgereiften, bovinen Chondrozyten nach 11-tägiger Zugabe von 0,5 mg/ml verschiedener KH, ein statistisch signifikanter Anstieg der Kollagen Typ II-Sekretion beobachtet wurde. Verwendet wurden hierfür KH boviner Herkunft des Gelatineproduzenten Gelita (vorwiegend aus Kollagen Typ I bestehend) sowie aus Hühnerknorpel stammende KH (vorwiegend aus Kollagen Typ II bestehend). Außerdem wurde in dieser Studie ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Kollagen Typ II-Sekretion bei Dosierungen zwischen 0,5 bis 5 mg/ml von bovinen, vorwiegend aus Kollagen Typ I bestehenden KH beschrieben. Die Studie zeigte weiter, dass nur Kollagenfragmente vom Typ I oder II, die Kollagen Typ II-Biosynthese stimulierten, nicht aber intaktes Kollagen oder kollagenfreie Proteinhydrolysate [73].

Eine weitere *in vitro*-Studie an Chondrozyten aus dem Jahre 2007 führten Ng et al. [70] durch. Hierfür wurden bovine Chondrozyten über einen Zeitraum von insgesamt sechs Wochen mit dem KH-Präparat Gelita Sol® D in Konzentrationen von 0,1 bis 10 mg/ml inkubiert und deren mechanische Eigenschaften sowie biochemische Zusammensetzung zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Während sich in den ersten vier Wochen nach Zugabe von 0,5 bis 1 mg/ml KH eine statistisch signifikante Steigerung des prozentualen Kollagen Typ II-Gehalts (bezogen auf den ermittelten Gesamtgehalt an Kollagen in den Proben) zeigte, konnten nach sechswöchiger Inkubation keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr nachgewiesen werden. Chondrozyten, die mit 10 mg/ml KH in-



kubiert wurden, zeigten im Vergleich den geringsten Gehalt an Kollagen Typ II. Des Weiteren konnte nach vierwöchiger Inkubation mit 1 und 10 mg/ml KH ein im Vergleich zur Kontrollgruppe zwei- bis dreifacher Anstieg der MMP-3 und -13-Genexpression festgestellt werden [70].

Eine andere *in vitro*-Studie aus dem Jahr 2010 von Raabe et al. [82] untersuchte den Einfluss von hydrolysiertem Fischkollagen auf multipotente Stromazellen aus equinem subkutanem Fettgewebe. In der Studie wurde berichtet, dass eine dreiwöchige Inkubation mit 0,5 mg/ml hydrolysiertem Fischkollagen die Chondrogenese der Stromazellen induzierte, die mit einer Steigerung der Kollagen Typ II- und Proteoglykansynthese einherging. Ferner konnte eine für die chondrogene Differenzierung charakteristische mRNA-Expression von Kollagen Typ II und Sox9 nachgewiesen werden [82].

Während oben aufgeführte Studien vor allem von anabolen Wirkungen verschiedener, meist nicht näher bezeichneten KH-Präparate berichteten, weisen Studien aus unserem Labor von Schadow et al. [89, 90] auf einen wesentlich komplexeren Sachverhalt hin: Schadow et al. [89] zeigten in einer Studie aus dem Jahr 2013 erstmals, dass sich bovine KH verschiedener Hersteller (CH-Alpha®, Peptan® B 2000 und Peptan® B 5000) sowohl in ihrer chemischen Zusammensetzung als auch in ihrer zellulären Wirkung auf Chondrozyten deutlich unterscheiden [89]. Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführte Untersuchungen konnten in dieser Studie qualitative Unterschiede von verschiedenen bovinen KH bezüglich der Weite ihrer Molekulargewichtsverteilung und dem durchschnittlichen Molekulargewicht selbst zutage fördern. Weitere, mittels Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force-microscope, AFM)-Analysen und Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic-resonance, NMR)-Spektroskopie durchgeführte Analysen bestätigten die Unterschiedlichkeit der verschiedenen KH-Präparate [89]. Auch in einer zweiten Studie von Schadow et al. [90] konnten deutliche Unterschiede in der biochemischen Zusammensetzung diesmal von verschiedenen fischhaltigen (Peptan® F 5000, Peptan® F 2000) und einem porkinen KH-Präparat (Mobiforte®) nachgewiesen werden. Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführte Analysen förderten hierbei erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen KH-Präparaten zu Tage. (Die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analysen sind zum Teil Gegenstand der vorliegenden Arbeit und werden teilweise im Ergebnis- und Diskussionsteil eingehend erläutert, siehe Kapitel 3.2.1 und 4.2.) Weitere, mittels NMR-Analyse durchgeführte Verfahren bestätigten auch hier die Heterogenität der verschiedenen KH-Präparate [90].

Schadow et al. [89, 90] führten außerdem verschiedene *in vitro*-Studien mit KH-Präparaten unterschiedlicher Herkunft durch. Hierfür verwendete Knorpelimplantate wurden aus humanen arthrotischen Kniegelenken gewonnen. Untersucht wurde die Wirkung von bovinen KH (CH-Alpha®, Peptan® B 2000 und Peptan® B 5000), Fisch-KH (Peptan® F 2000 und Peptan® F 5000) sowie KH porkiner Herkunft (Mobiforte®), mit denen die Knorpelimplantate in unterschiedlichen Konzentrationen von 0 bis 10 mg/ml über einen Zeitraum von sechs Tagen inkubiert wurden [89, 90]. Zusätzlich erfolgten zum Teil Inkubationen über drei Tage mit Zugabe von IL-1 $\beta$  [89]. Mittels moderner radioaktiver Doppelmarkierung der Knorpelimplantate konnten Schadow et al. nachweisen, dass keines der untersuchten KH die Kollagen Typ II-Synthese stimulierte und die Präparate Peptan® B 5000 und CH-Alpha® überdies die Kollagensynthese konzentrationsabhängig inhibierten [89, 90]. Ein durch KH induzierter Verlust an Kollagen wurde bei keinem der untersuchten Nährmedien festgestellt [89], und ein erhöhter Proteoglykanverlust wurde nur bei hohen Gaben von Mobiforte® (2 bis 10 mg/ml) beschrieben, wenngleich in höheren Konzentrationen hinzugegebenes Peptan® F 2000 die Aktivität der Aggrecanasen ADAMTS4 und -5 drastisch erhöhte [89, 90].

Die Zugabe von einigen KH-Präparaten (Peptan® B 5000, Peptan® B 2000, Peptan® F 5000, Mobiforte®) führte außerdem zu einem unterschiedlich starken Anstieg verschiedener MMPs [89, 90]. Die TIMP-1-Spiegel wurden dagegen von den meisten KH nicht beeinflusst. Lediglich die Zugabe von CH-Alpha® in hohen Konzentrationen (10 mg/ml) führte zu einer Abnahme der TIMP-1-Konzentration in den Nährmedien [89, 90]. Ferner führte die Zugabe von Peptan® B 5000 sowie von Peptan® F 2000 oder Mobiforte® zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des NO-Gehalts in den Nährmedien. Peptan® B 5000 und CH-Alpha® führten außerdem ab Konzentrationen von 1 bzw. 10 mg/ml KH zu einer Erhöhung der PGE<sub>2</sub>-Spiegel. Schließlich konnten sowohl bei Mobiforte® als auch bei Peptan® F 5000 konzentrationsabhängige Anstiege des IL-6-Gehalts verzeichnet werden. Keines der untersuchten KH-Präparate zeigte indes eine zytotoxische Wirkung [89, 90].

Die Untersuchungen von Schadow et al. [89, 90] stehen im Kontrast zu den Ergebnissen vorheriger *in vitro*-Studien. Als Gründe für die gegensätzlichen Ergebnisse sehen Schadow et al. unter anderem spezies-spezifische Unterschiede, verschiedenes Alter und Gesundheit der untersuchten Knorpelimplantate sowie Unterschiede in den verwendeten Untersuchungsmethoden an [90].

# 1 Einleitung

Studie	Proben	Ausgangsmaterial	Konzentration	Zelltyp	Zeitraum	Studienergebnisse
Jennings et al. [40]	Kollagenfragmente	Koll. Typ II, bovin	0 - 1 mg/ml	bovine und humane Chondrozyten; humane Knorpelimplantate	Zellen: 24 Std., Explantate: 3 Wochen	Zelladhäsion an Kollagen ↓, Synthese von Kollagen ↓; Matrixdegradation ↑
Fichter et al. [23]	Kollagenfragmente	Koll. Typ II, bovin; synthetisierte N-telopeptide	0 - 10 mg/ml; 0 - 1 mg/ml	bovine und humane Chondrozyten und Knorpelimplantate	Zellen: 4 Tage, Explantate: 3 Wochen	Gen- und Proteinexpression verschiedener MMPs ↑
Oesser et al. [73]	KH, Fortigel®	Koll. Typ I, bovin; Koll Typ II von Huhn	0,5 mg/ml; 0 - 10 mg/ml	bovine Chondrozyten	11 Tage	Synthese von Koll. Typ II ↑; bei 10 mg/ml: Synthese von Koll. Typ II ↓
Ng et al. [70]	KH, Gelita Sol D®	Kollagen, bovin	0 - 10 mg/ml	bovine Chondrozyten	6 Wochen	nach 4 Wochen: 0,5 - 1 mg/ml: Synthese von Koll. Typ II ↑; 10 mg/ml: Synthese von Koll. Typ II ↓; 1 und 10 mg/ml: MMP-Expression ↑
Raabe et al. [82]	KH	Kollagen aus Fisch	0 - 2,5 mg/ml	multipotente Stromazellen aus equinem Fettgewebe	3 Wochen	0,5 mg/ml: Koll. Typ II-Synthese ↑, PG-Synthese ↑, chondrogene Differenzierung (mRNA-Expression Koll. Typ II ↑, Sox9)
Schadow et al. [89]	CH-Alpha®	Kollagen (bovin) (Fortigel®)	0 - 10 mg/ml	humane Knorpelimplantate aus arthrotischen Kniegelenken	6 Tage	≥ 2 mg/ml: Koll. Typ II-Synthese ↓↓; 10 mg/ml: TIMP-1 ↓, PGE <sub>2</sub> ↑
	Peptan® B 2000	Kollagen, bovin				kein Einfluss auf Koll. Typ II-Synthese; 10 mg/ml: MMP-1 ↑;
	Peptan® B 5000	Kollagen, bovin				Koll. Typ II-Synthese ↓; MMP-1, -3, -13: ↑↑↑; NO ↑; PGE <sub>2</sub> ↑↑
Schadow et al. [90]	Peptan® F 2000	Kollagen aus Fisch	0 - 10 mg/ml	humane Knorpelimplantate aus arthrotischen Kniegelenken	6 Tage	kein Einfluss auf Koll. Typ II-Synthese; Aktivität ADAMTS4 ↓; 5 und 10 mg/ml: Aktivität ADAMTS4 ↑; 2 und 10 mg/ml: Aktivität ADAMTS5 ↑; 10 mg/ml: NO ↑
	Peptan® F 5000	Kollagen aus Fisch				kein Einfluss auf Koll. Typ II-Synthese; Aktivität ADAMTS4 ↓; 2 und 10 mg/ml: MMP-3 ↑↑, -13 ↑, IL-6 ↑↑; 10 mg/ml: MMP-1 ↑↑
	Mobiforte®	Kollagen, porkin				kein Einfluss auf Koll. Typ II-Synthese; Aktivität ADAMTS4 ↓; 2 und 10 mg/ml: MMP-1 ↑, PG-Verlust ↑↑; 10 mg/ml: MMP-3↑↑, NO ↑↑, IL-6↑
Ohara et al. [74]	Pro-Hyp-Peptide	nicht angegeben	50 µg/ml	aus Kaninchen stammende FLS	48 Std.	Hyaluronsäuresynthese ↑

**Tab. 1:** *In vitro*-Studien mit Kollagenderivaten. PG = Proteoglykan, Koll. = Kollagen.

Über die Wirkung von KH oder anderen Kollagenderivaten auf weitere Gelenkstrukturen ist bislang wenig bekannt. In einer Studie von Ohara et al. [74] aus dem Jahr 2010 wurde berichtet, dass Pro-Hyp-Peptide, die nach eigenen Angaben [75] die größte aus dem Verzehr von KH stammende Peptidgruppe im Blut darstellen, in der Lage waren, die Hyaluronsäuresynthese von FLS zu stimulieren. Hierfür waren aus Kaninchen stammende FLS für 48 Stunden mit Pro-Hyp-Peptiden (Bachem, Budendorf) inkubiert worden. Die vermehrte Synthese anderer GAGs wurde jedoch nicht beobachtet [74].

### 1.3.6.2 *In vivo*-Studien mit KH

Neben den oben beschriebenen *in vitro*-Studien finden sich in der Literatur außerdem einige Originalpublikationen, die sich mit der Wirkung von KH *in vivo* sowohl im Tiermodell als auch in Form von klinischen Studien befassen. Eine Übersicht über die hier aufgeführten Studien findet sich in Tab. 2.

Ohara et al. [74] untersuchten in ihrer bereits erwähnten Studie aus dem Jahr 2010 neben FLS-Kulturen *in vitro* außerdem die Wirkung von verschiedenen KH-Präparaten im Tiermodell. In den Untersuchungen zeigte sich, dass aus Fisch, nicht aber aus Schwein hergestelltes KH (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) bei Meerschweinchen zu einem statistisch signifikant erhöhten Pro-Hyp-Serumspiegel und Proteoglykangehalt in den Epiphysen führt. Ferner seien mit OA-assoziierte, morphologische Veränderungen im Knorpel reduziert worden. Den Tieren war hierfür über einen Zeitraum von vier Wochen fünfmal pro Woche KH oral verabreicht worden [74].

Klinische Studien zur Wirkung von KH erfolgten schon sehr früh. Adam et al. [4] publizierten im Jahr 1991 Daten aus einer randomisierten, doppelt verblindeten, cross-over-Studie an der 81 an OA erkrankte Patienten teilnahmen, in der verschiedenen KH- und Gelatinepräparaten eine schmerzreduzierende Wirkung zugeschrieben wurde. In dieser Studie wurde die klinische Wirkung einer 60-tägigen täglichen Einnahme von je 10 g KH (Gelita Sol D), Gelatine, Gelatine/Glycin/CaHPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O und Eialbumin untersucht. Verglichen wurden Schmerzen, der Analgetikakonsum, die Mobilität der Probanden sowie radiologische und laborchemische Veränderungen. Zur Bewertung der Schmerzen wurden 13 verschiedene Schmerz Aspekte, wie beispielsweise Anlauf- und Bewegungsschmerz, Myalgien oder nächtlicher Schmerz, auf einer dreistufigen Likert-Skala bewertet. Alle aus Gelatine hergestellten Präparate führten in dieser Studie im

Vergleich zum verwendeten Placebo (Eialbumin) zu einer signifikanten Linderung der Schmerzsymptomatik und zu einem um die Hälfte reduzierten Analgetika-Verbrauch. 29 der ursprünglich 81 Patienten brachen die Therapie allerdings vorzeitig ab [4, 67].

Eine weitere klinische Studie erfolgte von Clark et al. [17]. In dieser randomisierten, doppelt verblindeten, placebokontrollierten Studie wurde an 97 gesunden und sportlich aktiven Probanden untersucht, ob die tägliche Einnahme von 10 g des bovinen KH-Präparates CH-Alpha® zu einer Reduktion von leistungsbedingten Gelenkschmerzen führt. Mittels Visueller Analogskala (VAS) wurden hierfür Ruheschmerzen sowie Schmerzen bei verschiedenen Belastungen der Gelenke auf einer Skala von 1 bis 10 über einen Zeitraum von 24 Wochen beurteilt, wobei Stufe 1 Beschwerdefreiheit und Stufe 10 sehr schwere Symptomatik bedeuteten. Sowohl in Ruhe als auch bei Belastung zeigte sich in dieser Studie eine statistisch signifikante Besserung der Schmerzen nach Einnahme der KH im Vergleich zum verabreichten Placebo. Die durchschnittlich ermittelte Schmerzreduktion lag im Vergleich KH vs. Placebo bei den sechs statistisch signifikanten Parametern zwischen 0,81 ( $\pm$  9 %), vs. 0,39 ( $\pm$  4,3 %) und 1,79 ( $\pm$  19,9 %) vs. 1,26 ( $\pm$  14 %) [17].

Die bislang größte Untersuchung zur klinischen Wirkung von KH stammt von Moskowitz [67] aus dem Jahr 2000. In dieser ebenfalls randomisierten, doppelt verblindeten und placebokontrollierten Studie wurde die Wirkung einer täglichen Einnahme von 10 g aus pharmazeutischer Gelatine hergestellten KH an 389 Patienten mit OA-induzierten Kniegelenksschmerzen untersucht. Die Studie erfolgte multizentrisch in Deutschland, dem UK und den USA über einen Zeitraum von 24 Wochen und schloss mit einer achtwöchigen Auswaschphase ab. Während der Studie erfolgten regelmäßige Visitationen der Probanden. Zu den erhobenen Messparametern zählten unter anderem Schmerz, der mithilfe der VAS-Version des Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC)-pain-dimension-score auf einer Skala von 0 bis 500 mm beurteilt wurde, die Gelenkfunktion, die mithilfe des WOMAC-physical-function-dimension-score auf einer Skala von 0 bis 1700 mm ermittelt wurde sowie die Gesamteinschätzung der Patienten, deren Beurteilung auf einer Skala von 0 bis 4 erfolgte. Außerdem bestimmt wurden die Gelenksteifigkeit mittels WOMAC-stiffness-dimension-Skala, Schmerzen nach einer Gehstrecke von 50 m, das Auftreten von Gelenkergüssen und die Einnahme von Paracetamol. Lediglich in der deutschen Teilgruppe zeigte sich im Vergleich KH vs. Placebo eine statistische signifikante, wenngleich klinisch vermutlich

weniger relevante Schmerzreduktion von durchschnittlich 68,2 ( $\pm$  13,6 %) vs. 32,2 ( $\pm$  6,4 %) sowie eine Verbesserung der Gelenkfunktion von durchschnittlich 180,3 ( $\pm$  10,6 %) vs. 59,7 ( $\pm$  3,5 %). Eine erhöhte Wirksamkeit von KH wurde außerdem bei Patienten aus allen Teilgruppen beobachtet, die mit einer schweren Schmerzsymptomatik zu Beginn der Studie aufwarteten. Die Abbrecherquote unterschied sich in den drei Ländern deutlich (in den USA 42 %, in den UK 37 %, in Deutschland nur 7 %), ohne dass hierfür von den Autoren Gründe angegeben wurden [67].

Benito-Ruiz et al. [11] untersuchten in einer anderen multizentrischen, randomisierten, doppelt verblindeten und placebokontrollierten Studie, an der 250 Probanden teilnahmen, den Einfluss einer sechsmonatigen KH-Einnahme (10 g Colnatur® pro Tag) auf Kniegelenksschmerzen. Zusätzlich wurde in dieser Studie auch die Wirksamkeit einer KH-Behandlung bei Patienten mit hohem Konsum kollagenreicher Nahrung wie Fleisch untersucht. Die Wirkung der KH wurde mithilfe der Likert-Version des WOMAC-Scores bezüglich Schmerz (0 bis 20 Punkte), Behinderung (0 bis 68 Punkte) und Gelenksteifigkeit (0 bis 8 Punkte) ermittelt sowie mithilfe der VAS (Schmerzintensität, angegeben auf einer Skala von 0 bis 100 mm) und des Short-Form-(36)-Gesundheitsfragebogens. Die Studie berichtet von einer statistisch signifikanten Schmerzreduktion, die im Vergleich KH vs. Placebo beim WOMAC-pain-dimension-score durchschnittlich 4,9 ( $\pm$  24,5 %) vs. 3,8 ( $\pm$  19 %) und bei VAS 32,6 ( $\pm$  32,6 %) vs. 28 ( $\pm$  28 %) betrug und von klinischer Relevanz war. Jedoch zeigte sich diese Wirkung nicht bei Patienten mit einem retrospektiv ermittelten hohem Fleischkonsum [11].

Eine weitere klinische Untersuchung mit geringerem Stichprobenumfang stammt von McAlindon et al. [60]. Diese fand in einer randomisierten, doppelt verblindeten und placebokontrollierten Studie mit 30 Probanden, die über einen Zeitraum von 48 Wochen täglich 10 g Fortigel® einnahmen, einen radiologisch ermittelten Anstieg des Proteoglykangehalts nach der Hälfte der Behandlungszeit, jedoch nicht zum Endpunkt der Studie. Es konnten ferner keine messbaren Unterschiede in den klinischen Parametern, die mittels Röntgenbildern sowie VAS und WOMAC kontrolliert wurden, beobachtet werden [60]. Die methodische Qualität einiger der hier aufgeführten klinischen Studien [11, 17, 67] rangierte nach Henrotin et al. [34] im mittleren bis sehr guten Bereich. Zu einem ernüchternden Fazit kommen Van Vijen et al. [113] in ihrem Review-Artikel aus dem Jahre 2012, die insgesamt die Qualität der aktuellen Evidenzlage von KH als moderat bis sehr gering bewerten und abschließend zu dem Schluss gelangen, dass nach

## 1 Einleitung

Studie	Studienaufbau	Messinstrument	Probe	Ausgangsmaterial	Dosierung	Zeitraum	Objekt	Studienergebnisse
<b>Ohara et al. [74]</b>	randomisierte, placebokontrollierte Tierstudie; histologische Einteilung einfach verblindet	Beurteilung des histologischen Arthrosegrades mittels Mankin-Score	KH (Nitta Gelatine)	Koll. Typ I aus Schweinehaut oder Fischschuppen	0,84 g/kg /Tag	4 Wochen (5x/W)	Meerschweinchen (34)	Fisch-KH: Pro-Hyp-Gehalt im Serum und PG-Gehalt in Epiphysen ↑; nicht-signifikante Reduktion von OA-assoziierten morphologischen Knorpelveränderungen
<b>Adam et al. [4]</b>	randomisierte, doppelt verblindete und placebokontrollierte, cross-over-Studie	Bestimmung versch. Schmerz Aspekte mittels 3-stufiger Likertskala, Analgetikakonsum, Mobilität, radiologische und laborchemische Veränderungen	Gelita Sol D <sup>®</sup> , Gelatine, Gelatine/Glycin /CaHPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O, Eialbumin (Placebo)	Kollagen, bovin	10 g/Tag, oral	60 Tage	81 Patienten mit Gon- oder Coxarthrose	Bei KH und Gelatine-Präparaten: Schmerzen ↓, Analgetikakonsum ↓, hohe Drop-out-Rate
<b>Clark et al. [17]</b>	randomisierte, doppelt verblindete und placebokontrollierte Studie	Bestimmung versch. Schmerz Aspekte mittels VAS, Analgetikakonsum	CH-Alpha <sup>®</sup>	Kollagen, bovin (Fortigel <sup>®</sup> )	10 g/Tag, oral	24 Wochen	97 Probanden	Gelenkschmerzen ↓
<b>Moskowitz [67]</b>	randomisierte, multizentrische, doppelt verblindete und placebokontrollierte Studie	WOMAC-Scores, Gesamteinschätzung d. Patienten, Schmerzen nach 50 m Gehstrecke, Auftreten von Gelenkerguss, Paracetamolkonsum	pharmazeutisches KH	Kollagen	10 g/Tag, oral	60 Tage	389 Patienten mit Gonarthrose	Keine Besserung in Gesamtgruppe; deutsche Teilgruppe: Schmerzen ↓ und Gelenkfunktion ↑, hohe Drop-out-Rate
<b>Benito-Ruiz et al. [11]</b>	randomisierte, multizentrische, doppelt verblindete und placebokontrollierte Studie	WOMAC-Scores, VAS, Short-Form-(36)-Gesundheitsfragebogen	Colnatur <sup>®</sup>	Kollagen, porkin	10 g/Tag, oral	24 Wochen	250 Patienten mit Gonarthrose	Schmerzen ↓, keine Schmerzreduktion in Subgruppe mit retrospektiv ermittelten hohem Fleischkonsum
<b>McAlindon et al. [60]</b>	randomisierte, doppelt verblindete und placebokontrollierte, cross-over-Studie	mittels versch. MRT-Verfahren detektierbare Veränderungen im OA-Knorpel, WOMAC-Scores, VAS, Chair-Stand, 20 m Gehstrecke, Analgetikakonsum	Fortigel <sup>®</sup>	Kollagen, bovin	10 g/Tag, oral	48 Wochen	30 Patienten mit Gonarthrose	klinisch keine Besserung; Woche 24: PG-Gehalt an medialer und laterale Tibia ↑

**Tab. 2:** *In vivo*-Studien mit Kollagenhydrolysaten. Koll. = Kollagen, PG = Proteoglykan.

derzeitigem Stand keine ausreichende Datenlage besteht, um allgemein den täglichen Gebrauch von KH bei OA-Patienten zu empfehlen [113].

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

KH stellen ein Gemisch aus einer Vielzahl von Peptiden dar, die mittels hydrolytischen und enzymatischen Abbaus aus tierischem, kollagenhaltigem Gewebe gewonnen werden. Sie werden unter anderem als Nahrungsergänzungsmittel für Patienten mit OA vermarktet [5, 89]. Sowohl ihre Wirkung als auch die zugrundeliegenden Mechanismen sind Gegenstand aktueller Forschung. In Drogerien, Apotheken und im Internet findet sich eine große Anzahl an unterschiedlichen KH-Präparaten, die von verschiedenen Firmen nach unveröffentlichten Herstellungsverfahren aus unterschiedlichen Tierarten hergestellt werden. Angesichts dessen ist derzeit nicht bekannt, ob von einem in allen KH-Präparaten gemeinsamen Inhalts- und Wirkstoff im Sinne einer identischen Zusammensetzung an KH-Peptiden gesprochen werden kann. Studien von Schadow et al. [89, 90] legen nahe, dass es sich bei KH-Präparaten um viele unterschiedliche Peptidmixturen handelt, die aus kollagenem Gewebe verschiedener Tierarten gewonnen werden. Darüber hinaus gibt es keine Angaben in der Literatur, inwiefern zumindest verschiedene Herstellungschargen ein- und desselben KH-Präparates eine identische Zusammensetzung und Konzentration von KH-Peptiden besitzen. Basierend auf den Ergebnissen von Schadow et al. [89, 90] war es Ziel dieser Arbeit, biochemische Unterschiede der KH-Präparate mittels massenspektrometrischer Analysen weiter zu quantifizieren und außerdem erstmals verschiedene Chargen von KH-Präparaten ein- und desselben Herstellers auf Unterschiede zu überprüfen. Weiter sollte in dieser Arbeit erstmals die zelluläre Wirkung von KH-Präparaten und -Chargen auf humane synoviale Fibroblasten, die aus osteoarthritischen Gelenken isoliert wurden, unter *in vitro*-Bedingungen untersucht werden.



Folgende Fragen sollten mit dieser Arbeit beantwortet werden:

- Unterscheiden sich KH-Präparate verschiedener Hersteller bzw. die Chargen eines KH-Präparates in ihrer biochemischen Zusammensetzung an Peptiden?
- Unterscheiden sich verschiedene Chargen eines KH-Präparates in ihren Konzentrationen an gemeinsam vorhandenen Peptiden?
- Welche zellulären Wirkungen haben verschiedene KH-Präparate auf humane FLS, und unterscheiden sich verschiedene KH-Präparate bzw. verschiedene Chargen eines KH-Präparates in ihrer Wirkung?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Probenmaterial

Für die Versuche, die sich mit der zellulären Wirkung von KH auf FLS beschäftigten, wurde synoviales Gewebe aus Kniegelenken von OA-Patienten aus der Orthopädischen Universitätsklinik Gießen verwendet. Die Proben stammten von synovialen Kapselgewebe, das im Rahmen von Operationen aus arthrotischen Kniegelenken entfernt wurde. Die Patienten wurden über die Entnahmen aufgeklärt und hatten sich mit der Nutzung der Gewebeproben zu Forschungszwecken schriftlich einverstanden erklärt. Ein positives Votum der Ethik-Kommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität war am 18.12.2003 (Antragsnummer 106/03) erteilt worden und wurde am 02.07.2009 hinsichtlich eines Amendments für die Verwendung von synovialen Kapselgewebe erweitert.

#### 2.1.2 Patientenbeschreibung

Alle Patienten wurden aufgrund der Diagnose OA an den Kniegelenken operiert. Die Patienten wiesen häufig eine präadipöse bis adipöse Konstitution auf. Besonders häufig zeigten die Patienten als Begleiterkrankung eine arterielle Hypertonie. Außerdem fanden sich bei mehreren Patienten eine koronare Herzkrankheit (KHK), Herzrhythmusstörungen, Divertikulose sowie ein Asthma bronchiale-Leiden, siehe Tab. 3.

	Hauptversuch 3 (Wirkung der KH auf FLS)
N	6
Alter (Jahre) $\bar{X} \pm SD$	70,5 $\pm$ 8,3
Geschlecht	♂ (5x); ♀ (1x)
BMI $\bar{X} \pm SD$	28,6 $\pm$ 2,8
Diagnose	Gonarthrose
Operative Therapie	Bikondyläre Oberflächenersatzprothese (1x), Knie-Totalendoprothese (4x), Oxfordschlittenimplantation (1x)
Besondere Begleiterkrankungen	Arterielle Hypertonie (5x); KHK (4x); Herzrhythmusstörungen (2x), Divertikulose (2x). Asthma bronchiale (2x), Z. n. Hüft-TEP (2x)

**Tab. 3:** Patientenbeschreibung von Spendern von synovialen Gewebe.

### 2.1.3 Geräte

Analysenwaage Typ 770-12	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Autoklav Typ 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL
Autosampler Typ AS50 (RP-HPLC)	Dionex GmbH, Idstein
CO <sub>2</sub> -Inkubator Cellstar	Nunc GmbH, Wiesbaden
CO <sub>2</sub> -Inkubator Typ Heracell 150i	Thermo Scientific GmbH, Dreieich
Detector, Typ UVD170U (RP-HPLC)	Dionex GmbH, Idstein
Digitalwaage Typ PC 440	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Elektrophorese Netzgerät PowerPowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
FACS-Zytometer FACSCanto™	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Gradient Pump, Typ GP50 (RP-HPLC)	Dionex GmbH, Idstein
H2O-Anlage-MilliQ® Synthesis A10	Merck KGaA, Darmstadt
8-Kanalpipette 10 - 100 µm, 30 - 300 µm	Eppendorf AG, Hamburg
12-Kanalpipette 10 - 100 µm	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlschrank 4°C, Typ KGU 66920	Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Kühlzentrifuge Typ Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Lichtmikroskop Typ Axiovert® 40 CFL	Carl Zeiss AG, Göttingen
Lyophilisator Typ LDC-1m Alpha 1-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode

Magnetrührer MR 3002, 800 W	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
MALDI-Target MTP Anchor Chip™ 384 TF, 400 µm	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Massenspektrometer, Typ Ultraflex I-TOF/TOF	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Mikrotiterplatten-Photometer Typ SUNRISE™	Tecan Group GmbH Austria GmbH, Grödig
Minizentrifuge Typ 5414	Eppendorf AG, Hamburg
Minizentrifuge Typ 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Mr. Frosty – Freezing Container	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Mastercycler® Personal	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten P2, P10, P100, P1000, P10 ml	Gilson Inc. Middletown, USA
Pipetten 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy, Easypet®	IBS, Integra, Fernwald
Präzisionswaage Typ EG2200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Präzisionswaage Typ ABJ 120-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Pumpe Typ 16612	Sartorius AG, Göttingen
Säule, Typ XBridge C18	Waters GmbH, Eschborn
Sicherheitswerkbank der Klasse II, Typ Biological Safety Cabinet, Mikroflow®	Thermo Scientific GmbH, Dreieich

Speedvac Typ Jouan RC 10.22	Thermo Scientific GmbH, Dreieich
Thermal Compartment, Typ AS50	Dionex GmbH, Idstein
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoshaker Typ LD-45	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Tiefkühlschrank -20°C, Typ KGE 34422	Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Tiefkühlschrank -86°C, Typ HFU 486 Top	Thermo Electron GmbH, Langenselbold
Trockenschrank, Typ 700	Memmert GmbH, Hamburg
Ultraschallbad Typ S 40	Elma Electronic AG, Wetzikon, Schweiz
Vortexer Typ Genie 2T	Scientific Industries Inc., New York, USA
Vortexer Typ Reax 1 R	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad Typ AQUAline AL 5	LAUDA DR. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Typ 3 Universal 320	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

#### 2.1.4 Software

Citavi for Windows Version 5.3.1.0	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
eulerAPE Version 3.0.0	GNU General Public License published by the Free Software Foundation [65]
flexAnalysis Version 3.4	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
GraphPad Prism® Version 5.03	GraphPad Software Inc., San Diego, USA

Microsoft® Office Home and Student 2010 (Word und Excel®)	Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond, USA
---	--

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Bechergläser, Duran 50 ml, 100 ml, 500 ml	Schott Medica GmbH, Wertheim
Cell Scraper 25 cm, steril, #541070	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Combitips plus®, 5 ml, 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Einmal-Pinzetten, 12,5 cm steril	Seidel Medizin GmbH, Buchendorf
Einwegskalpell, Nr. 21, #31602740	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Filtrationsgerät Express™ Plus® 0,22 µm	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
Gewebskulturenplatte-6-Well Nunc® #10469282	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Gewindeflasche und Kombinations- verschluss (RP-HPLC), Typ ND10	Medchrom GmbH, Flörsheim-Dalsheim
8-Kanal-Pipetten, #BRA 704526	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Konische Röhrchen 15 und 50 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Mikroeinsatz für Rollrandampullen und Schnappspringflaschen (RP-HPLC), #06090865	Medchrom GmbH, Flörsheim-Dalsheim
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg
PCR-Röhrchen 0,2 ml	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Petrischalen, #632181, 94 x 16 mm	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1250 µl	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße Typ Lobind Tube 0.5 ml ,1.5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße 0.5, 1.5, 2.0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
RP-SPE-Kartuschen, Typ Discovery-DSC18	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Standzylinder/Messzylinder 100 ml, 250 ml,1000 ml	Schott Medica GmbH, Wertheim
U-Becher PP 125 ml, graduert mit SV PE rot, einzeln verpackt, steril	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
96-well-ELISA Mikrotiterplatten, #3	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellfiltersieb 70 µm, steril	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturflaschen Typ T-75	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenfilter Amicon Ultra 0,5 ml Typ 3K	Merck KGaA, Darmstadt

### **2.1.6 Chemikalien**

Accutase, #L11-007	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Acetonitril, ROTISOLV®, HPLC Gradient Grade, #H8825.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aqua dest. Ecotainer® 1l	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Argon 5.0 ≥ 99,999 %	Praxair Deutschland GmbH, Düsseldorf

CH-Alpha® Trinkampulle, LOT-Nr. L115/1031, L88/1031, L170/1031	Quiris Healthcare, Gütersloh, früher GELITA Health Products GmbH, Eberbach
Chloroform LiChrosolv #1.02444.1000	Merck KGaA, Darmstadt
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (HCCA), #C-2020	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC). Aqua dest., #P119C	Promega GmbH, Mannheim
2,5-Dihydroxybenzoesäure $\geq 99,0$ % puriss. p.a., #85707	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethyl-Sulphoxid (DMSO), #D2650	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dispase II, #P10032100	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
D-MEM medium w/o Phenol Red, #P04-01515	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
D-MEM medium, #P04-01550	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Douset Ancillary Reagent Kit 2, #DY008	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) 1 x, #H15-002	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) 10x, #161-0780	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Ethanol absolut 99,8 %, #32205	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fetales Kalbserum, #F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Flüssiger Stickstoff (Kühlmittel)	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf



Gamunex® 10 %-Infusionslösung, #80A0597	Bayer AG, Leverkusen
Guanidiniumhydrochlorid, #50940	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HEPES-PUFFER 1M, #15630-056	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe
Human CXCL8/IL-8 Immunoassay Quantikine® ELISA, #D8000C	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Human IL-1β Assay, ELISA Kit, #KHC0011	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe
Human IL-1β Quantikine® ELISA, #DLB50	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Human IL-6 High Sensitivity, #BMS213HS	eBioscience Inc., San Diego, USA
Human MMP-1 ELISA Kit, #ELH-MMP1	RayBiotech Inc., Norcross, USA
Human MMP-13 ELISA Kit, #ELH-MMP13	RayBiotech Inc., Norcross, USA
Human Pro-MMP-13 Quantikine® ELISA, #DM1300	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Human-total MMP-3 Quantikine® ELISA, #DMP300	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Human TIMP-3 DouSet, #DY973	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Human TNF-α Assay, ELISA Kit, #KHC3014	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe
Human TNF-α Quantikine® ELISA, #DTA00C	R&D Systems GmbH, Wiesbaden

Methanol, min. 99,9 %, #3486	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methyldiphosphonsäure $\geq 99,0$ % BioChemika, #64255	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mobiforte <sup>®</sup> , LOT-Nr. 11/2016/L07, 11/2016/L06	Astrid Twardy GmbH, Unterföhring
Monoclonal Antibody to Fibroblasts, #SM124PS	Acris Antibodies GmbH, Herford
Mycoplasma Test Kit I/C, #PK-CA91-1024	PromoCell GmbH, Heidelberg
0,9 % NaCl-Lösung Ecotainer <sup>®</sup> B., #190/12606084/0912	Braun Melsungen AG, Melsungen
NaOH 50 %, reinst, #8655	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcitrat, #71402	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumhydroxid Merck KG, #1.06469.1000	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumnitrit, puriss. p.a., #31443	Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze
PeqGOLD TriFast <sup>™</sup> , #12-6834-00	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Natronlauge 30 % Suprapur <sup>®</sup> , #1.05589.0250	Merck KGaA, Darmstadt
Nitrat-Reduktase 20 U, #981249	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
2-Propanol, UV/IR Grade, #T910.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N-1-Naphtylethylenediamin Dihydrochlorid, #N-5889	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x) [1000 U/ml] Penicillin, [10 mg/ml] Streptomycin, #P0781	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Peptan® B 2000 LD, LOT-Nr. 1048665, 1266793/x	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
Peptan® B 5000 HD, LOT-Nr. 1247582	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
Peptan® F 2000 LD, LOT-Nr. 1010903	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
Peptan® F 5000 HD, LOT-Nr. 101372	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
Peptide Calibration Standard II for mass spectrometric covered mass range ~700-4000 Da, #222570	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Phosphorsäure, 85 % puriss. p. a., #30417	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pierce™ BCA Protein Assay Kit, #23225	Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobuline/RPE Rabbit (F(ab') <sub>2</sub> , #DAK-R043901-2	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Prostaglandin E <sub>2</sub> EIA Kit - Monoclonal, #514010	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, cOmplete™, #04 693 116 001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Salzsäure, rauchend, > 37 %, #84422	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Salzsäure 35 % Rotipuran® supra Qualität, #HN53.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SERVA ICPL™ Kit, #39230.01	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sodiumdodecylsulfat ultra pure ≥ 99.5 %, #23261.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sulfanilamie, 99 %, #S9251	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tetrahydrofuran ROTIPURAN® > 99,5 % p.a. ACS, #67881	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trifluoressigsäure, R3 Protein Sequencer Grad, #400003	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triflouroessigsäure, 25 %, #400003	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trypan Blue, #1117320025	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin/EDTA, #P19-024100	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

### 2.1.7 Lösungen und Puffer

#### Reverse Phase-Festphasenextraktion:

<b>Elutionslösung (= 0,1 %ige Trifluoressigsäure-Lösung)</b>	<b>Lösungsmittel (= 1 %ige Trifluoressigsäure-Lösung)</b>	<b>Waschlösung (= 0,1 %ige Trifluoressigsäure und 80 %ige Acetonitril-Lösung)</b>
500 µl Trifluoressigsäure, 499,5 ml Aqua dest.	5 ml Trifluoressigsäure, 495 ml Aqua dest.	500 µl Trifluoressigsäure, 400 ml Acetonitril, 99,5 ml Aqua dest.

**Tab. 4:** Herstellung der Elutionslösung, Lösungsmittel und der Waschlösung für die reverse Phase-Festphasenextraktion

Reagenzien mit Magnetrührer gut miteinander vermengen.

#### Reverse Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie:

<b>Lösungsmittel A (= 5 %ige Acetonitril und 0,1 %ige Trifluoressigsäure-Lösung)</b>	<b>Lösungsmittel B (= 80 %ige Acetonitril und 0,1 %ige Trifluoressigsäure-Lösung)</b>
25 ml Acetonitril 500 µl Trifluoressigsäure 474,5 ml Aqua dest.	400 ml Acetonitril 500 µl Trifluoressigsäure 99,5 ml Aqua dest.

**Tab. 5:** Herstellung von Lösungsmittel A und B für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Reagenzien mit Magnetrührer gut miteinander vermengen.

#### ICPL™ - Derivatisierung:

<b>2 N Salzsäure</b>	<b>2 N Natronlauge</b>
1,8 ml 35 %ige Salzsäure, 8,2 ml Aqua dest.	2,0 ml 30 %ige Natronlauge, 8 ml Aqua dest.

**Tab. 6:** Herstellung von 2 N Salzsäure und 2 N Natronlauge

Reagenzien mit Magnetrührer gut miteinander vermengen.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie:

Lösungsmittel für Analyten:

- 0,1 %ige Trifluoressigsäure-Lösung siehe *Elutionslösung, Reverse Phase-Festphasenextraktion*

Matrix - 2,5-Dihydroxybenzoesäure und Methylendiphosphorsäure (jeweils 5 mg/ml):

- 50 µl 2,5-Dihydroxybenzoesäure (10 mg/ml)
- 50 µl Methylendiphosphonsäure (10 mg/ml)

Die Reagenzien zusammenführen, anschließend für eine gründliche Vermischung zwei Minuten vortexen. Bei -20°C ca. zwei Wochen haltbar.

Zellkultur:

<b>Nährmedium (2 % fetales Kalbserum, engl. foetal bovine serum, FBS)</b>	<b>Nährmedium (10 % FBS)</b>
D-MEM 480 ml HEPES (1 M) 5 ml Penicillin/Streptomycin (100 x) 5 ml FBS 10 ml	D-MEM 440 ml HEPES (1 M) 5 ml Penicillin/Streptomycin (100 x) 5 ml FBS 50 ml

**Tab. 7:** Nährmedium mit 2 % FBS und 10 % FBS

Sterilfiltrieren, bei 4°C maximal 14 Tage haltbar.

Protease-Inhibitor-Cocktail:

Die Tabletten „Protease-Inhibitor- (PI-) Cocktail“ wurden bei 4°C gelagert. Nach Lösen in 5 ml Aqua dest. wurden sie direkt verbraucht.

Nachweis von NO mittels Griess-Reaktion:

Griess-Reagenz:

- 100 mg Sulfanilamide
- 10 mg N-1-naphtylethylenediamine Dihydrochlorid
- 10 ml 25 %ige Phosphorsäure

Die Reagenzien wurden mit einem Magnetrührer miteinander vermengt und waren bei 4°C für ca. elf Monate lagerbar.

**Nitrat-Reduktase:**

20 U wurden in 8 ml Aqua dest. aufgelöst, vorsichtig gemischt und anschließend aliquottiert zu je 0,5 ml. Bei -20°C war diese für ca. sechs Monate haltbar.

**Herstellung des Nitrit-Standards:**

Für die Herstellung des Nitrit-Standards wurden 41,1 mg NaNO<sub>2</sub> in 100 ml Aqua dest. gelöst. Im Anschluss wurden davon 10 ml abgenommen und mit 100 ml Aqua dest. verdünnt. Bei 4°C war der Nitrit-Standard für ca. einen Monat haltbar.

Für jede Messung wurde eine Standardreihe in Duplikaten erstellt. Die Konzentration des Nitrit-Standards wurde hierbei in Schritten von 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 und 30 nM/ml aufgetragen. Hierfür wurde in eine 96-Well-Mikrotiterplatte in 5 µl Schritten (jeweils 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50 µl) vom Nitrit-Standard pipettiert. Den Volumina wurde Aqua dest. hinzugegeben, bis schließlich alle ein Volumen von 50 µl enthielten.

### **2.1.8 Kollagenhydrolysate**

Hauptversuch 1 und 2 (Analyse mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie):

150 mg der pulverisierten KH wurden in 15 ml 0,1 % Trifluoressigsäure (engl. trifluoroacetic acid, TFA) gelöst. Die Konzentration entsprach 10 mg/ml. Bei dem flüssigen CH-Alpha<sup>®</sup> wurden, um ebenfalls eine Konzentration von 10 mg/ml zu erhalten, 0,375 ml des CH-Alpha<sup>®</sup> entnommen und anschließend mit Lösungsmittel auf ein Volumen von 15 ml aufgefüllt.

Hauptversuch 3 (Zelluläre Untersuchung an FLS):

Jeweils 500 mg der als Trockensubstanz vorliegenden KH-Präparate wurden zunächst in 2,5 ml Nährmedium (2 % FBS) gelöst und gründlich mittels Vortexer gemischt. Die gelösten KH-Präparate und das bereits in flüssiger Form vorliegende CH-Alpha<sup>®</sup> wurden dann mit Nährmedium (2 % FBS) so verdünnt, dass die Endkonzentration pro 100 µl 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 und 5 mg/ml betrug.

## Material und Methoden

Hersteller	Kollagenhydrolysat	Charge (LOT-Nr.)	Spezies	Durchschnittliches Molekulargewicht (Herstellerangabe)	Einnahmeform	Zusätzliche Inhaltsstoffe	Massenspektrometrische Analyse	Zellkultur mit FLS
Rousselot	Peptan® B 2000 LD <sup>1</sup> (RDH-N)	1048665	Rind	2000 Da	Pulver	keine Angabe	erfolgt	erfolgt
		1266793/x					erfolgt	erfolgt
	Peptan® B 5000 HD <sup>2</sup> (RDH)	1247582	Rind	5000 Da	Pulver	keine Angabe	erfolgt	erfolgt
	Peptan® F 5000 HD (FGH)	101372	Fisch	5000 Da	Pulver	keine Angabe	erfolgt	nicht erfolgt
	Peptan® F 2000 LD (FGH-N)	1010903	Fisch	2000 Da	Pulver	keine Angabe	erfolgt	nicht erfolgt
Twardy	Mobiforte®	11/2016/L07	Schwein	keine Angabe	Pulver	Vitamin C, pflanzliches Öl	erfolgt	erfolgt
		11/2016/L06					erfolgt	erfolgt
Gelita	CH-Alpha®	L115/1031	Rind	keine Angabe	Trinkampulle	Fortigel®, Fruktose, Zitronensäure, Malzextrakt, Vitamin C, Kaliumsorbat, Acesulfiram K, Aroma, Natrium-Cyclanat	erfolgt	erfolgt
		L88/1031					erfolgt	erfolgt
		L170/1031					erfolgt	nicht erfolgt
<sup>1</sup> LD = Low Density 0.4-0.55 g/cm³ (Herstellerangabe)								
<sup>2</sup> HD = High Density 0.25-0.35 g/cm³ (Herstellerangabe)								

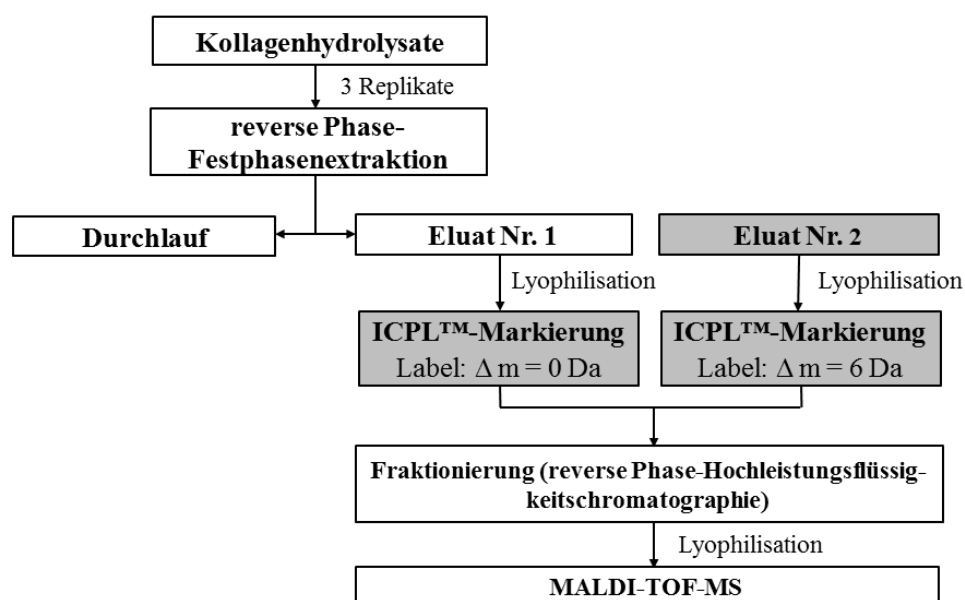
**Tab. 8:** Beschreibung der verwendeten KH-Präparate



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Biochemische Analyse der KH-Präparate

Um die in den KH-Präparaten enthaltenen Peptide einer massenspektrometrischen Analyse mittels MALDI-TOF zugänglich zu machen, müssen die KH-Präparate verschiedenen Aufbereitungsschritten unterzogen werden: Hierzu wurden die enthaltenen KH-Peptide in jeweils drei Replikaten zunächst mithilfe einer reversen Phase-Festphasenextraktion von Zusatzstoffen gereinigt, um mögliches Hintergrundrauschen zu vermeiden und die Sensitivität und Messgenauigkeit zu erhöhen. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der KH mittels reverser Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in 15 Fraktionen, um bei den komplexen Peptidgemischen so wenige Überlagerungen wie möglich in den Massenspektren zu erhalten. Zuletzt wurde die zu untersuchende KH-Probe in einer Matrix für die MALDI-TOF-Analyse gelöst und anschließend auskristallisiert. Um quantitative Aussagen bezüglich der Konzentrationen von gemeinsamen, in zwei KH-Präparaten vorkommenden Peptiden zu ermöglichen, wurde im Hauptversuch 2 vor der Fraktionierung der Proben zusätzlich eine Markierung mit ICPL™ (Isotope Coded Proteine Labelling) durchgeführt.



**Abb. 1:** Darstellung der Aufbereitung der KH-Präparate für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Hauptversuch 1 und 2). Die im Hauptversuch 2 zusätzlich vor der massenspektrometrischen Analyse durchgeführte Markierung mit ICPL™ und das anschließende Zusammenführen der zuvor zweigeteilten Eluate sind grau unterlegt.

### 2.2.1.1 Reverse Phase-Festphasenextraktion

Bei der reversen Phase-Festphasenextraktion (engl. reversed phase-solid phase extraction, RP-SPE) wurden die in den KH-Präparaten enthaltenen Peptide extrahiert. Hierfür wurden die gelösten KH-Präparate nach vorheriger Aktivierung der C18-Säulen durch Spülung der RP-Säulen mit 5 ml Elutionslösung und anschließendem Waschen mit 10 ml Waschlösung auf die C18-Säulen aufgegeben. Hierbei wurden die Peptide der KH-Präparate an die C18-Säulen gebunden. Der entstandene Durchlauf wurde erneut auf die C18-Säulen gegeben und anschließend separat verwahrt. Danach wurden die Säulen mit 10 ml Waschlösung gewaschen. Zuletzt erfolgte die Elution der Peptide mit 10 ml Elutionslösung. Um das in hoher Konzentration enthaltene Acetonitril wieder zu entfernen, wurden die Eluate danach für ein bis zwei Stunden in einer Speedvac bei 1.200 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Proben lyophilisiert, in Lösungsmittel gelöst (10 mg/ml) und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.1.2 ICPL™-Derivatisierung

Um, wie in Hauptversuch 2 durchgeführt, die Konzentrationen von Peptiden zweier Chargen miteinander vergleichen zu können, erfolgte zusätzlich zur Aufreinigung der KH-Peptide eine Isotopen-Markierung der Proben mit ICPL™-Reagenzien. Hierbei werden freie Aminogruppen (= N-Termini der Peptide sowie Lysin- und Hydroxylysinreste) der in den KH-Peptiden enthaltenen Aminosäuren mit verschiedenen schweren N-Nicotinoyloxy-Succinimid-Isotopen markiert [91]. Die unterschiedlichen Molekülmassen der beiden Isotope kommen durch die Verwendung von  $^1\text{H}$ - und  $^2\text{H}$ -Wasserstoffatomen in den ICPL™-0- und ICPL™-6-Reagenzien zustande. Der Massenabstand der beiden Isotope beträgt  $\Delta m = 6,0204$  Da. Anschließend werden die beiden Proben zusammengeführt. Durch die Markierung mit den beiden unterschiedlich schweren Isotopen erscheinen nach der Messung für das jeweilige KH-Peptid zwei Peaks im Massenspektrum: Peak 1 stammt aus Probe 1 und Peak 2 aus Probe 2. Die beiden Peaks haben dabei einen genau definierten Massenabstand von  $\Delta m = 6,0204$  Da bzw. einem Vielfachen davon bei Mehrfachmarkierungen der Peptide. Mithilfe der Intensitäten der beiden Peaks kann durch die Bildung des Intensitätsverhältnisses ein quantitativer Vergleich der beiden Peakintensitäten und damit der zugrundeliegenden Konzentrationen des jeweiligen KH-Peptids aus den beiden Proben erfolgen.

Für die Derivatisierung wurden die beiden zu vergleichenden, zuvor aufbereiteten KH langsam gemäß Angaben des Herstellers aufgetaut und präzipitierte Peptide mittels Vortexer und Ultraschallbad resuspendiert. Anschließend wurden von jeder Probe 10 µl ( $\pm$  100 µg KH-Peptide) abpipettiert und erneut lyophilisiert. Nun wurden die Proben in je 20 µl Lysis Puffer des ICPL™-Kits aufgenommen und jeweils 3 µl ICPL™-Reagenz zur Derivatisierung hinzugegeben. Die Proben wurden vorsichtig mit Argon überschichtet, 10 Sekunden gevortext, eine Minute in ein Ultraschallbad gelegt und daraufhin für zwei Stunden bei 25°C inkubiert. Um den Derivatisierungsprozess zu beenden, wurde im Anschluss 2 µl Stop-Solution aus dem ICPL™-Kit auf die Proben gegeben und erneut bei 25°C für 20 Minuten inkubiert. Die beiden Proben wurden nun zusammengeführt und gründlich mithilfe des Vortexers vermischt. Um mögliche Veresterungsprodukte zu zerstören, wurden anschließend 2 µl 2 molare NaOH-Lösung dazugegeben, um einen pH von 11,9  $\pm$  0,1 zu erreichen. Die Proben wurden daraufhin ein weiteres Mal für 20 Minuten inkubiert. Im letzten Schritt wurden 2 µl 2 molare HCl-Lösung zur Neutralisierung des pH-Werts dazugegeben. Die Proben wurden bei –20° C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **2.2.1.3 Fraktionierung (RP-HPLC)**

Ziel der Fraktionierung mittels reverser Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. reversed phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC) war es, durch Auftrennung einer KH-Probe in mehrere Fraktionen in der darauffolgenden MALDI-TOF-Massenspektrometrie möglichst viele KH-Peptide in den Massenspektren zu detektieren. Dies ist insbesondere bei komplexen Peptidmischungen wie den untersuchten KH-Präparaten sinnvoll, um Überlagerungseffekte in den Massenspektren zu vermeiden. Die Auftrennung der Peptide erfolgte nach ihrer Polarität mithilfe einer unpolaren stationären Phase, der Waters XBridgeC18-Säule, und einer polaren mobilen Phase, dem Lösungsmittel B, welches anteilig zum unpolaren Lösungsmittel A die stationäre Phase durchlief. Die Fließrate betrug 200 µl/min bei einer Temperatur von 40°C. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Der Gradient der Lösungsmittel A und B während der RP-HPLC betrug dabei:

1. 0 - 5 Minuten: 0 % Lösungsmittel B, 100 % Lösungsmittel A,
2. 5 - 35 Minuten: 0 - 100 % Lösungsmittel B, 100 - 0 % Lösungsmittel A,
3. 35 - 40 Minuten: 100 % Lösungsmittel B, 0 % Lösungsmittel A, und
4. 41 - 60 Minuten: 0 % Lösungsmittel B, 100 % Lösungsmittel A.

Die Gesamtdauer der RP-HPLC-Fraktionierung betrug eine Stunde. Es wurden 15 Fraktionen erstellt. Die peptidhaltigen Fraktionen 4 - 8 wurden in Zweiminutenschritte unterteilt. Die Fraktionen 1 - 2 sowie 9 - 15 enthielten keine Peptide und wurden in jeweils 5 Minuten unterteilt (siehe Tab. 9). Fraktion 3 enthielt zumeist nur wenige Peptide und dauerte 5 Minuten.

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Beginn (Minute)</b>	0	5	10	15	17	19	21	23	25	30	35	40	45	50	55

**Tab. 9:** Fraktionierung der Proben mittels RP-HPLC.

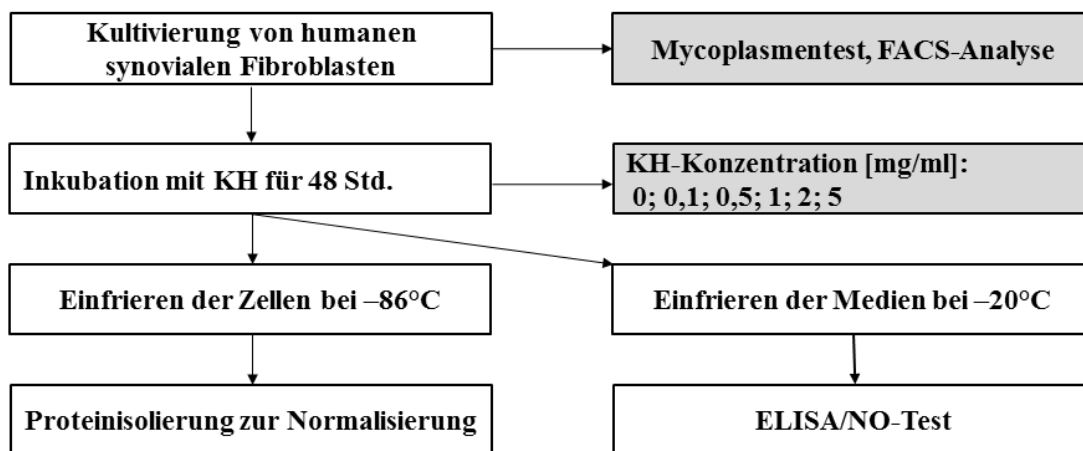
Nichtmarkierte Proben wurden, bevor sie die RP-HPLC durchliefen, aufgetaut und die enthaltenen KH-Peptide mithilfe von Vortexer und Ultraschallbad resuspendiert und anschließend lyophilisiert. Für die RP-HPLC-Fraktionierung wurden daraufhin 12,5 µg der KH-Peptide in 20 µl 0,1 % Trifluoressigsäure-Lösung (engl. trifluoroacetic acid, TFA), siehe auch 2.1.6 *Lösungsmittel aus RP-SPE*, gelöst und in das Injektionsglas für die RP-HPLC-Fraktionierung pipettiert. ICPL™-markierte Proben wurden, bevor sie die RP-HPLC durchliefen, langsam aufgetaut und anschließend mithilfe von Vortexer und einminütigem Ultraschallbad in ihrer Lösung resuspendiert. Danach wurden von der mittels ICPL™ markierten Probe 13 µl abgenommen und in das Injektionsglas für die RP-HPLC-Messung pipettiert und mit 0,1 %iger TFA-Lösung auf 20 µl aufgefüllt. Nun wurde mit der RP-HPLC-Fraktionierung begonnen. Die einzelnen Fraktionen wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäßen aufgefangen. Das in der Lösung hochkonzentrierte Acetonitril wurde mithilfe einer Speedvac bei 1.200 rpm und einer Laufzeit von 1 - 2 Stunden entfernt. Daraufhin wurden die Lösungen mittels Lyophilisation getrocknet und bei -20°C eingefroren.

#### 2.2.1.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Matrix-assoziierte-Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitanalyse (engl. matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight, MALDI-TOF) stellt nach den einzelnen Aufbereitungsschritten die eigentliche Analyse des KH-Peptidgemisches dar. Hierfür werden die fraktionierten KH-Proben in einer Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure, DHB und Methylendiphosphorsäure, MDPA) eingebettet und mit dieser gemeinsam auskristallisiert. Mittels gepulstem Laser-Beschuss der sich in einem Vakuum befindenden Probe werden nun die KH-Peptide in gasförmiger Phase aus dem Kristall herausgelöst (= Desorption) und ionisieren. Die ionisierten KH-Peptide werden im Anschluss in einem elektrischen Feld beschleunigt und in der Flugzeitanalyse nach ihrem zugrundeliegenden Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt. Die Ergebnisse der Messung werden anschließend im Massenspektrum dargestellt. Die Akquirierung der Massenspektren erfolgte manuell mit einem Massenspektrometer von Bruker Daltonics (Typ: Ultraflex I-TOF/TOF). Der Messbereich wurde von 500 bis 4000  $m/z$  definiert, das Messoptimum lag im Massenbereich von ca. 800 bis 2500  $m/z$ . Verwendet wurde hierbei ein gepulster Laserbeschuss (50 Schuss pro Einzelmessung) mit einer Wellenlänge von 337 nm (Nitrogen-Laser) und einer Extraktionsspannung von 25 kV. Durchschnittlich erfolgten etwa 300 - 600 Schüsse pro Fraktion eines KH-Präparates. Für das endgültige Massenspektrum einer Probe wurden mehrere dieser Einzelmessungen durchgeführt. Die gefundenen Peaks wurden so lange aufaddiert, bis ein Optimum von Intensität der Peaks und Hintergrundrauschen in einem „Summenmassenspektrum“ erreicht worden war. Die lyophilisierten Proben wurden hierfür in 50  $\mu$ l 0,1 %iger TFA-Lösung mittels Vortexer und drei Minuten Ultraschallbad resuspendiert. Anschließend wurden 1  $\mu$ l der Probe gemeinsam mit 1  $\mu$ l Matrix auf das MALDI-Target pipettiert (Anchor-Durchmesser 400  $\mu$ m) und mithilfe der Pipette gut vermengt. Analog dazu wurde als interner Standard für die MALDI-TOF-Messung ein definiertes Peptidgemisch (Peptide Calibration Standard II) auf das MALDI-Target aufgetragen. Danach wurden die Proben und der Standard getrocknet. Nachdem die Matrix und der enthaltene Analyt auskristallisiert waren, wurde das MALDI-Target in das MALDI-TOF-Gerät eingeschleust und die Messungen durchgeführt.

### 2.2.2 Zelluläre Wirkung der KH auf kultivierte FLS

Im Hauptversuch 3 wurde die Freisetzung von Zytokinen, katabolen Enzymen und NO aus kultivierten humanen FLS nach 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen KH-Präparaten und -Chargen in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Die Prüfung auf Freisetzung der Zytokine, katabolen Enzyme und NO erfolgte mittels ELISA-Tests bzw. Griess-Reaktion. Zur Normalisierung der Daten wurde der jeweilige zelluläre Proteingehalt der Zellkultur in Triplikaten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgetragen wurden, bestimmt.



**Abb. 2:** Graphische Darstellung der Durchführung des Hauptversuchs 3.

#### 2.2.2.1 Isolation und Kultivierung der FLS

Die frischen synovialen Kapselwandstücke aus dem Operationssaal wurden bis zu ihrer weiteren Präparation in 0,9 %iger Natriumchloridlösung (NaCl) bei 4° bis 20° C gelagert. Anschließend wurde das Gewebe zur Begutachtung und weiteren Bearbeitung unter sterilen Kautelen in einer Sicherheitsbank der Klasse II in eine Petri-Schale gelegt und mit kalter, steriler phosphatgepufferter Salzlösung (engl. phosphate buffered saline, PBS) gewaschen. Bei den Explantaten handelte es sich zumeist um ein Gemisch von innerer Kapselwand mit Synovialmembran und daran angrenzendes Fettgewebe. Der für die Präparation interessierende innere Teil der Kapselwand, die Synovialmembran, erschien pink- bis braunfarben und war von feinvillöser Struktur. War das Explantat verwertbar, wurde es anschließend in eine frische Petri-Schale gelegt und kurz mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung übergossen. Das synoviale Gewebe wurde nun mit einem chirurgischen Skalpell vorsichtig von den angrenzenden Blutgefäßen und Fettgewebe ab-

getrennt, isoliert und in mehreren Schritten zerkleinert, bis die einzelnen Bestandteile eine Größe von etwa 1 mm<sup>3</sup> besaßen. Das zerkleinerte synoviale Gewebe wurde nun in 50 ml sterile Falcon-Tubes überführt und mit 2 ml Dispase II zur Verdauung und 20 ml sterilen PBS für eine Stunde bei Zimmertemperatur auf einen Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde das aufbereitete synoviale Gewebe durch ein 70 µm feines Sieb gegeben und in einem neuen 50 ml Falcon-Tube aufgefangen, um die FLS möglichst in Reinform zu erhalten. Daraufhin wurden die Zellen mittels 10-minütiger Zentrifugation (300 g, 37°C) pelletiert und vorsichtig mit 15 ml 10 % fetales Kalbserum- (engl. foetal bovine serum, FBS) Nährmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 10 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Nährmedium wurde dreimal pro Woche gewechselt.

Um genügend Zellen für den Hauptversuch zu erhalten, wurden die FLS bei 80 - 90 % Konfluenz passagiert [69]. Hierfür wurde das Nährmedium komplett entfernt und die Zellkulturflasche mit 10 ml PBS gewaschen, welches anschließend wieder entfernt wurde. Danach wurden die adhätierenden Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mittels 3 ml Trypsin/EDTA, mit dem die Zellen bei 37°C für vier Minuten inkubiert wurden, gelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Trypsinisierung anschließend durch Zugabe von 5 ml 10 % FBS Nährmedium gestoppt. Nun wurde der Boden der Zellkulturflaschen mit dem enthaltenen Medium durch Pipettieren mehrfach gewaschen und das Medium mit den nun gelösten Zellen zur folgenden 10-minütigen Zentrifugation (300 g, 37°C) in einen frischen 15 ml Falcon-Tube gegeben. Das entstandene Zellpellet wurde in 4 ml Nährmedium aufgenommen und in zwei neue Zellkulturflaschen in gleichen Teilen mit je 2 ml verteilt. Anschließend wurden jeweils weitere 13 ml Nährmedium den neuen Zellkulturflaschen hinzugegeben, um insgesamt ein Volumen von 15 ml zu erhalten. Die passagierten Zellen wurden erneut im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 10 % CO<sub>2</sub> und 95 %iger relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Waren genügend Zellen herangewachsen, wurden diese für einige Monate bei -86°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren und gelagert.

#### **2.2.2.2 Inkubation der FLS mit KH-Präparaten**

Für die Inkubation der FLS mit KH-Präparaten wurden FLS der 2. - 4. Zellpassage verwendet [69]. Alle Zellen wurden mittels eines Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-Kits

negativ auf Mycoplasmen getestet. Die Durchführung erfolgte gemäß Instruktion des Herstellers. Mithilfe einer Fluoreszenz-markierten-Durchflusszytometrie (engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den kultivierten Zellen um FLS handelte. Hierfür wurden jeweils 50 000 Zellen entnommen. Positiv- und Negativkontrollen erfolgten mit HLA/MHC-I-Antikörpern und polyklonalen Antikörpern gegen murine Immunglobuline. Für die Identifikation der FLS wurde ein monoklonaler fibroblastenspezifischer Antikörper (SM1214PS) eingesetzt.

Um den Versuch zu starten, wurden an Tag 1 die kultivierten FLS eines Patienten gepoolt. Etwa 80 000 FLS wurden pro Well in eine 6-Well-Multischale gegeben. Anschließend wurden jeweils 4 ml 10 % FBS Nährmedium hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Zelldichte in den Wells überprüft und die Zellen mit je 4 ml 2 % FBS Nährmedium bei 37°C für eine Stunde auf dem Schüttler gewaschen. Danach wurde für weitere 24 Stunden eine Zell-Starvation mit 4 ml 2 % FBS Nährmedium durchgeführt, um die Zellen an ein serumarmes Nährmedium zu gewöhnen. An Tag 3 wurden die Zellen erneut mit je 4 ml 2 % FBS Nährmedium für eine Stunde gründlich auf dem Schüttler gewaschen.

Anschließend wurde der Hauptversuch gestartet: Hierfür wurden jeweils 100 µl der gelösten Kollagenhydrolysate in den Konzentrationen 0 (= Kontrolle), 0.1, 0.5, 1, 2 und 5 mg/ml zusammen mit 4 ml 2 % FBS in D-MEM-Medium für 48 Stunden zu den Zellkulturen der Probanden P2-P6 gegeben. Abweichend hiervon wurden bei dem Probanden P1 Konzentrationen von 0.05, 0.1, 0.5, 1 und 2 mg/ml eingesetzt. Konzentrationen von 0,05 mg/ml wurden somit nur bei einem Probanden untersucht, siehe auch 11.3. Nach 48 Stunden wurde der Versuch beendet. Dazu wurden die Multischalen zunächst leicht geschüttelt, um alle sezernierten Proteine von den Zelloberflächen in das Nährmedium zu spülen. Das Nährmedium wurde anschließend entnommen, mit jeweils mit 0,4 ml PI-Cocktail (10 % vol/vol) versetzt, um eine Degradation der sezernierten Proteine zu vermeiden und anschließend mittels Vortexer gründlich gemischt. Danach wurde das Volumen bestimmt, aliquottiert und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden sofort in 1 ml Lysepuffer des Trifast™-Kits durch mehrfaches Aufziehen mit der Pipette gründlich gelöst und lysiert und anschließend mit einer Pipette in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Die Proben wurden bei -86°C eingefroren und waren so für mehrere Monate haltbar.



### 2.2.2.3 Normalisierung der Messergebnisse

Zur Normalisierung der Daten wurde der jeweilige zelluläre Proteingehalt der Zellkulturen bestimmt. Die zellulären Proteine wurden mithilfe des oben genannten Isolierungssystems Trifast™ aus den Proben gewonnen. Hierbei wurden die Proteine der Zelllysate durch Zugabe von Isopropanol präzipitiert und durch anschließende Zentrifugation pelletiert. Durch mehrfaches Waschen mit 0,3 M Guanidinhydrochlorid-Lösung wurden Verunreinigungen entfernt. Die Pellets wurden getrocknet und in 1 % Sodiumdodecylsulfat (SDS) -Lösung resolubilisiert. Die Proteinisolierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die isolierten Proteine waren daraufhin bei -20°C für mindestens ein Jahr haltbar. Der zelluläre Proteingehalt der Proben wurde mithilfe eines Bicinchoninsäure-Assays (BCA) in Triplikaten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgetragen wurden, gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Bei der BCA-Reaktion werden zweifach positiv geladene Kupferionen in alkalischem Medium durch Proteine zu einfach positiv geladenen Kupferionen reduziert. Die einfach positiv geladenen Kupferionen führen zusammen mit zwei BCA-Molekülen zu einer Chelatkomplexbildung mit Farbreaktion, die zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung des Proteingehalts genutzt werden kann [99]. Das Kit ermöglicht die kolorimetrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen zwischen 20 – 2.000 µg/ml und erfolgte bei 560 nm.

### 2.2.3 Vorversuche zur Wahl des S/N

Das Signal-zu-Rauschverhältnis (engl. signal-to-noise ratio, S/N) gibt in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie das Verhältnis von der gemessenen Intensität eines Signals/Peaks zu der Intensität des jeweiligen Hintergrundrauschens an. Je geringer das gewählte S/N ist, desto mehr Peaks erscheinen im Massenspektrum, desto größer ist jedoch auch die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den erscheinenden Peaks nicht um die interessierenden KH-Peptide handelt, sondern um Artefakte wie beispielsweise Matrixpolymere. Eine relativ zuverlässige Möglichkeit der Identifikation von Peptiden ist mithilfe der ICPL™-Markierung gegeben: Hierbei haben die entsprechend markierten Peptidpaare einen exakt definierten Massenabstand von  $\Delta m = 6,0204$  Da oder eines Vielfachen davon und sind dadurch als Peptide identifizierbar (siehe auch 2.2.1.3). Ziel der Vorversuche war es, erstens zu prüfen, ob sich ein optimales S/N ermitteln lässt, bei dem einerseits möglichst wenige Artefakte und andererseits möglichst viele Peaks im

Massenspektrum erscheinen, und ob zweitens bei ICPL™-markierten KH ein anderes S/N als bei nichtmarkierten KH verwendet werden sollte.

### **2.2.3.1 Prüfung auf das Vorhandensein eines optimalen S/N**

Für die Prüfung auf das Vorhandensein eines optimalen S/N wurde für jeweils ein Replikat der KH-Präparate CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031, L88/1031 und L170/1031), Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x), Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582), Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 1010903), Peptan® F 5000 (LOT-Nr. 101372) sowie Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06) eine Kurve erstellt, die in der Ordinate das jeweilige S/N von  $\geq 3$  bis  $\geq 500$  und in der Abszisse die zum entsprechenden S/N zugehörige Anzahl an gefundenen Peaks im Massenspektrum abbildete. Hiermit sollte ermittelt werden, ob sich ein S/N in Form eines sich auf den Kurven darstellenden Plateaus finden lässt, bei dem die Anzahl an ermittelten Peaks bei ansteigendem S/N abschnittsweise konstant bleibt.

### **2.2.3.2 Vergleich von Gesamtzahl und dem prozentualen Anteil der reproduzierbaren Peaks bei unterschiedlichen S/N**

In diesem Vorversuch sollte überprüft werden, ob sich erstens die Gesamtzahl an Peaks in den Massenspektren signifikant ändert, wenn einmal ein S/N von  $\geq 3$  und einmal ein S/N von  $\geq 10$  verwendet wird. Finden sich bei einem S/N von  $\geq 3$  signifikant mehr Peaks als bei einem S/N von  $\geq 10$ , sollte bei einer zusätzlichen Identifikationsmöglichkeit von Peptiden - beispielsweise mithilfe von ICPL™ - ein niedrigeres S/N gewählt werden, um möglichst alle im Massenspektrum vorhandenen Peptide in die Analyse miteinzubeziehen. Zweitens sollte weiter in diesem Vorversuch überprüft werden, ob sich der jeweilige prozentuale Anteil an reproduzierbaren Peaks in den drei Replikaten eines KH-Präparates signifikant verändert, wenn einmal ein S/N von  $\geq 3$  und einmal ein S/N von  $\geq 10$  verwendet wird. Hierfür wurden zunächst die reproduzierbaren Peaks gemäß 2.2.5.2 einmal bei einem S/N von  $\geq 3$  und einmal bei einem S/N von  $\geq 10$  ermittelt. Anschließend wurde für jedes Replikat bestimmt, wie groß der jeweilige prozentuale Anteil der reproduzierbaren Peaks bezogen auf alle enthaltenen Peaks war.

Die so bei unterschiedlichen S/N ermittelten prozentualen Anteile der einzelnen Replikate wurden im Folgenden miteinander verglichen. Verwendet wurden exemplarisch die jeweiligen drei Replikate der KH-Präparate Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 1010903), zwei Chargen von CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031) und zwei Chargen von Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06).

#### **2.2.4 Vorversuch: Vergleich der Standardkurven von TIMP-3-ELISA**

Für die Ermittlung von sezernierten Zytokinen und anabolen bzw. katabolen Enzymen mittels ELISA ist für jede Untersuchung eine Standardreihe mit definierten Verdünnungen in Duplikaten oder Triplikaten erforderlich, anhand derer die kolorimetrische Bestimmung des Gehalts der zu bestimmenden Substanz in den Proben gemessen wird. Gemäß Herstellerangabe sollen die Standardreihen mit im Kit mitgelieferten Lösungen angesetzt werden. Im hier exemplarisch gewählten Falle von *Human TIMP-3* handelte es sich dabei um den mitgelieferten „Reagent Diluent“. Ziel des Vorversuches war es zu prüfen, ob sich markante Unterschiede in den ermittelten Standardkurven ergeben, wenn die Standards einmal in dem mitgelieferten „Reagent Diluent“ und einmal in den Nährmedien der zu untersuchenden Proben angesetzt werden. Überprüft sollte dies werden, indem die ermittelten Standardkurven hinsichtlich ihrer errechneten Steigung und Achsenschnittpunkte miteinander verglichen wurden.

#### **2.2.5 Hauptversuch 1: Qualitativer Vergleich von KH-Präparaten**

Ziel dieses Hauptversuches war es zu ermitteln, ob sich verschiedene KH-Präparate bzw. Chargen in ihrer jeweiligen Anzahl an KH-Peptiden und deren Zusammensetzung unterscheiden. Untersucht wurden folgende KH-Präparate und Chargen:

- Mobiforte®: LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06
- CH-Alpha®: LOT-Nr. L115/1031, L88/1031 und L170/1031
- Peptan® B 2000: LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x
- Peptan® B 5000: LOT-Nr. 1247582
- Peptan® F 2000: LOT-Nr. 1010903
- Peptan® F 5000: LOT-Nr. 101372

### 2.2.5.1 Reproduzierbarkeit der Messmethode

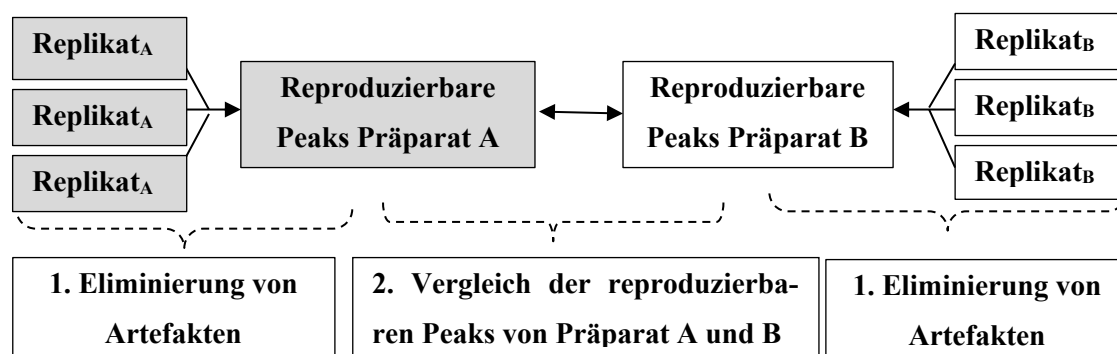
Die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen stellt in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie nach wie vor eine Herausforderung dar. So findet sich in jedem angefertigten Replikat eines KH-Präparates eine gewisse Anzahl an Peaks, die nicht reproduzierbar sind und folglich nicht in den weiteren Replikaten derselben Probe erscheinen. Ziel dieses Versuches war es zu ermitteln, ob der prozentuale Anteil an reproduzierbaren Peaks mit der in 2.2.1.1-2.2.1.5 beschriebenen Messmethode in den Replikaten bei verschiedenen KH-Präparaten bzw. Chargen stets der gleiche ist und somit ein Vergleich verschiedener KH-Präparate und -Chargen zulässig ist. Hierfür wurden aus den drei angefertigten Replikaten aller in 2.2.5 aufgeführten KH-Präparate die reproduzierbaren Peaks gemäß 2.2.5.2 bestimmt und der jeweilige prozentuale Anteil, den die reproduzierenden Peaks bezogen auf die Gesamtzahl an vorkommenden Peaks in einem Replikat ausmachten, ermittelt. Das gewählte S/N betrug  $\geq 10$ . Anschließend wurden die prozentualen Anteile der drei Replikate eines KH-Präparates mit denen anderer KH-Präparate bzw. -Chargen verglichen.

### 2.2.5.2 Ermittlung der reproduzierbaren Peaks

Um Artefakte auszuschließen, wurden in Hauptversuch 1 bei einem gewählten S/N  $\geq 10$  zunächst die reproduzierbaren Peaks aus den peptidhaltigen Fraktionen 3 - 8 der drei Replikate eines KH-Präparates ermittelt. Als reproduzierbar galt ein Peak, wenn er in allen drei Replikaten eines KH-Präparates gemeinsam in derselben oder einer direkt angrenzenden Fraktion auftrat und in allen drei Replikaten eine identische Massenzahl mit einer maximalen Massenabweichung von 50 ppm (geräteabhängiger Parameter) besaß. Traten identische Peaks mehrfach in direkt benachbarten Fraktionen eines Replikates auf, so wurden diese als ein Peak gewertet. Das Auftreten von identischen Peaks in mehreren benachbarten Fraktionen erklärt sich durch die Elutionszeit von 30 Sekunden eines KH-Peptids während der RP-HPLC. Die Anzahl der so ermittelten reproduzierbaren Peaks eines KH-Präparates wurde bestimmt und die reproduzierbaren Peaks mit Massenzahl und Fraktionsnummer aufgelistet (siehe Tab. Anhang 11.1.1).

### 2.2.5.3 Auswertungsverfahren: Ermittlung von gemeinsamen reproduzierbaren Peaks bei verschiedenen KH-Präparaten bzw. -Chargen

Um die ermittelten reproduzierbaren Peaks verschiedener KH-Präparate bzw. -Chargen miteinander vergleichen zu können, wurde geprüft, ob sich in den zu untersuchenden KH-Präparaten reproduzierbare Peaks finden, die in beiden KH-Präparaten gemeinsam auftreten. Reproduzierbare Peaks in zwei oder drei KH-Präparaten bzw. Chargen galten als identisch, wenn sie dieselbe Massenzahl bei einer maximalen Massenabweichung von 50 ppm (geräteabhängiger Parameter) aufwiesen und in der gleichen oder einer direkt angrenzenden Fraktion vorkamen. Die Anzahl der so ermittelten gemeinsamen reproduzierbaren Peaks eines KH-Präparatvergleiches wurde bestimmt und die entsprechenden Peaks mit Massenzahl, Fraktionsnummer und Zugehörigkeit zum jeweiligen KH-Präparat aufgelistet (siehe Tab. Anhang 11.1.3). Bei dem Vergleich von drei KH-Präparaten wurde außerdem die Anzahl an Peaks bestimmt, die in zwei KH-Präparaten gemeinsam vorkamen.



**Abb. 3:** Graphische Darstellung des Auswertungsverfahrens des Hauptversuchs 1

### 2.2.5.4 Referenzmessungen

Um sicherzustellen, dass Unterschiede beim Vergleich von zwei oder drei KH-Präparaten nicht durch technische Messfehler verursacht wurden, erfolgte zusätzlich die Ermittlung von Referenzwerten, indem zwei Referenzvergleiche durchgeführt wurden: Hierfür wurde die Charge LOT-Nr. L170/1031 des KH-Präparates CH-Alpha® an drei verschiedenen Tagen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analog zu den anderen KH-Präparaten untersucht und an jedem Tag die jeweiligen reproduzierbaren Peaks aus den Replikaten bestimmt. Bei Referenzvergleich Nr. 1 wurden zwei Messungen der

CH-Alpha®-Charge miteinander verglichen; bei Referenzvergleich Nr. 2 wurden alle drei Messungen der CH-Alpha®-Charge miteinander verglichen. Aufgrund der Aufbereitung der Proben mithilfe von RP-SPE und RP-HPLC konnte gewährleistet werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließlich Peptide extrahiert wurden. Daher wurden die Referenzwerte Nr. 1 und Nr. 2, die anhand einer CH-Alpha®-Charge ermittelt worden waren, auch für die Vergleiche von Präparaten anderer Hersteller verwendet.

#### Referenzvergleich Nr. 1:

Für die Bestimmung des Referenzwertes Nr. 1 wurden die reproduzierbaren Peaks von zwei unterschiedlichen Messungen der CH-Alpha®-Charge (LOT-Nr. L170/1031) miteinander verglichen und die Anzahl an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks, wie in 2.2.5.3 beschrieben, ermittelt. Der prozentuale Anteil, den die gemeinsamen reproduzierbaren Peaks von allen vorhandenen reproduzierbaren Peaks der beiden Messungen ausmachten, wurde als Referenzwert Nr. 1 den Vergleichen von zwei verschiedenen KH-Präparaten bzw. Chargen zugrunde gelegt.

#### Referenzvergleich Nr. 2:

Für die Bestimmung des Referenzwertes Nr. 2 wurden die reproduzierbaren Peaks von drei unterschiedlichen Messungen der CH-Alpha®-Charge (LOT-Nr. L170/1031) miteinander verglichen und die Anzahl an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks, wie in 2.2.5.3 beschrieben, ermittelt. Der prozentuale Anteil, den die gemeinsamen reproduzierbaren Peaks von allen vorhandenen reproduzierbaren Peaks der drei Messungen ausmachten, wurde als Referenzwert Nr. 2 den Vergleichen von drei verschiedenen KH-Präparaten bzw. Chargen zugrunde gelegt.

#### **2.2.5.5 Vergleich von zwei oder drei KH-Präparaten**

Untersucht wurde, ob sich verschiedene KH-Präparate bzw. Chargen erstens in ihrer jeweiligen Anzahl an Peaks und zweitens in ihrer jeweiligen Zusammensetzung an reproduzierbaren Peaks voneinander unterscheiden. Ad 1: Um zu überprüfen, ob sich verschiedene KH-Präparate bzw. Chargen in ihrer Anzahl an Peaks in ihren Replikaten

unterscheiden, wurde die jeweiligen Anzahlen aller gemessenen Peaks der 3 Replikaten eines KH-Präparates mit denen eines anderen KH-Präparates verglichen. Ad 2: Um zu überprüfen, ob sich zwei oder drei KH-Präparate in ihrer Zusammensetzung an reproduzierbaren Peaks unterscheiden, wurde zunächst ermittelt, wie groß der prozentuale Anteil all derjenigen Peaks ist, die gemeinsam in allen der zwei bzw. drei zu vergleichenden KH-Präparate vorkommen (bezogen auf alle vorhandenen Peaks der zu vergleichenden KH-Präparate). Der ermittelte prozentuale Anteil wurde anschließend mit dem dazugehörigen Referenzwert Nr. 1 oder Nr. 2 verglichen (siehe 2.2.5.4).

<b>Vergleich von KH-Präparaten unterschiedlicher Hersteller</b>	CH-Alpha <sup>®</sup> und Peptan <sup>®</sup> B 2000 Mobiforte <sup>®</sup> und Peptan <sup>®</sup> B 2000 Mobiforte <sup>®</sup> und CH-Alpha <sup>®</sup> Mobiforte <sup>®</sup> , CH-Alpha <sup>®</sup> und Peptan <sup>®</sup> B 2000 (2x)
<b>Vergleiche von KH-Präparaten desselben Herstellers</b>	Peptan <sup>®</sup> F 2000 und Peptan <sup>®</sup> B 2000 Peptan <sup>®</sup> F 2000 und Peptan <sup>®</sup> F 5000 Peptan <sup>®</sup> B 2000 und Peptan <sup>®</sup> B 5000 Peptan <sup>®</sup> B 5000 und Peptan <sup>®</sup> F 5000
<b>Chargenvergleiche eines KH-Präparates</b>	Mobiforte <sup>®</sup> (2 Chargen) Peptan <sup>®</sup> B 2000 (2 Chargen) CH-Alpha <sup>®</sup> (3 Chargen)

**Tab. 10:** Erfolgte Präparat- und Chargenvergleiche

## 2.2.6 Hauptversuch 2: Quantitativer Chargenvergleich mittels ICPL™

Ziel dieses Hauptversuches war es zu überprüfen, ob sich die Konzentrationen von gemeinsam vorhandenen KH-Peptiden bei zwei unterschiedlichen Chargen eines KH-Präparates unterscheiden. Um in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie quantitative Aussagen treffen zu können, müssen die Intensitäten zweier Peaks miteinander verglichen werden. Ein solcher Vergleich ist dabei nur dann zulässig, wenn dieser innerhalb desselben Massenspektrums erfolgt. Mittels ICPL™ ist, wie in 2.2.1.3 beschrieben, eine solche quantitative Aussage möglich. Erfolgte Chargenvergleiche mit ICPL™:

- Mobiforte<sup>®</sup>, Chargen: LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06,
- Peptan<sup>®</sup> B 2000, Chargen: LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x,
- CH-Alpha<sup>®</sup>, Chargen: LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031.

### 2.2.6.1 Auswertungsverfahren von ICPL<sup>TM</sup>-markierten Proben

Für den quantitativen Vergleich von gemeinsam vorhandenen KH-Peptiden wurden zunächst bei jedem Replikat die ermittelten Peaks aus den Massenspektren mit ihrer jeweiligen Fraktionsnummer, Massenzahl ( $m/z$ ) und Intensität charakterisiert. Das gewählte S/N betrug in diesem Versuch  $\leq 3$ , da aufgrund der Markierung mittels ICPL<sup>TM</sup> eine weitere Identifikationsmöglichkeit der Peaks als Peptide bestand (siehe 2.2.3). Anschließend wurden für jeden Peak mögliche Peakpartner gesucht. Als Peakpaar galten zwei Peaks, wenn für sie zutraf, dass bei einem beliebigen Peak im Massenspektrum ein weiterer Peak aus derselben Fraktion ermittelt werden konnte, der einen Massenunterschied von  $\Delta m = 6,0204$  bzw.  $12,0408$  Da bei einer maximalen Massenabweichung von 50 ppm (geräteabhängiger Parameter) besaß. Peakpaare mit einem Abstand von  $\Delta m = 18.0612$ ,  $24.0816$  oder  $30.102$  Da oder Peaks mit mehreren potentiellen Peakpartnern wurden nicht berücksichtigt, da aufgrund der Komplexität der Probe in diesen Fällen keine sichere Aussage mehr darüber getroffen werden konnte, ob es sich hierbei tatsächlich um ein einzelnes markiertes Peakpaar, Artefakte oder Überlagerungseffekte handelte. Um mengenmäßige Unterschiede, die beispielsweise beim Zusammenführen der beiden markierten Proben entstanden waren und die potentiell zu einer Verfälschung des quantitativen Vergleichs der beiden Chargen führen würden, zu eliminieren, wurde anschließend ein Korrekturfaktor ermittelt, um ein exaktes Mengenverhältnis der beiden Proben zu gewährleisten: Dafür wurden zunächst die Intensitätsverhältnisse aller gefundenen Peakpaare ermittelt (Peakintensität-ICPL<sup>TM</sup>\_6-Reagenz/Peakintensität-ICPL<sup>TM</sup>\_0-Reagenz) und das arithmetische Mittel aller Intensitätsverhältnisse gebildet. Das gebildete arithmetische Mittel wurde daraufhin als Korrekturfaktor verwendet, indem die Intensitäten der Peaks, die mit ICPL<sup>TM</sup>\_0-Reagenz markiert worden waren, mit dem Korrekturfaktor multipliziert wurden. Danach wurden erneut die Intensitätsverhältnisse der Peakpaare gebildet (Peakintensität-ICPL<sup>TM</sup>\_6-Reagenz/korrigierte Peakintensität-ICPL<sup>TM</sup>\_0-Reagenz). Im Anschluss wurde geprüft, welche der ermittelten Peakpaare reproduzierbar in allen drei Replikaten eines ICPL<sup>TM</sup>-Chargenvergleiches gemeinsam auftraten. Als identisch galten Peakpaare, wenn diese in allen drei Replikaten in derselben oder einer direkt angrenzenden Fraktion auftraten, denselben Massenunterschied ( $\Delta m = 6.0204$  bzw.  $12.0408$ ) besaßen und eine maximale Massenabweichung von 50 ppm (geräteabhängiger Parameter) bestand. Trat ein Peakpaar mit identischer



Massenzahl in mehreren benachbarten Fraktionen gleichzeitig auf, so wurden diese als ein einziges Peakpaar gewertet. Das Auftreten von identischen Peakpaaren in mehreren benachbarten Fraktionen erklärt sich durch die Elutionszeit von 30 Sekunden der KH-Peptide während der RP-HPLC. Die Anzahl der so ermittelten reproduzierbaren Peakpaare wurde bestimmt und die Peakpaare mit der Massenzahl des jeweiligen mit ICPL™-0-Reagenz markierten Peaks und den dazugehörigen ermittelten Intensitätsverhältnissen aufgelistet.

#### **2.2.6.2 Chargenvergleich**

Liegt ein Peptid in beiden Chargen eines KH-Präparates in gleicher Konzentration vor, so müsste das dazugehörige ermittelte Peakpaar theoretisch ein Intensitätsverhältnis von 1:1 besitzen. Bei komplexen Probengemischen können jedoch auch noch Intensitätsverhältnisse zwischen  $\geq 0,8$  und  $\leq 1,2$  auf ein eigentliches Intensitätsverhältnis von 1:1 hinweisen [16]. Ob bei zwei Chargen eines KH-Präparates die Konzentrationen an gemeinsam vorhandenen Peptiden insgesamt identisch waren, wurde mithilfe der Referenzmessung ermittelt: Dazu wurde der Anteil an Peakpaaren, die ein Intensitätsverhältnis von  $\geq 0,8$  und  $\leq 1,2$  besaßen, mit dem entsprechenden Anteil der in 2.2.6.3 beschriebenen Referenzmessung verglichen.

#### **2.2.6.3 Referenzmessung**

Um sicherzustellen, dass Unterschiede beim Vergleich zweier KH-Chargen nicht durch technische Messfehler verursacht werden, wurde zusätzlich eine Referenzmessung durchgeführt: Hierfür wurde eine Charge des KH-Präparates Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) zweifach markiert, einmal mit dem leichten ICPL™-0- und einmal mit dem schweren ICPL™-6-Isotop. Die Durchführung und Auswertung erfolgte analog zu den Chargenvergleichen in drei Replikaten. Anschließend wurde, wie in 2.2.6.2 beschrieben, der Anteil derjenigen Peakpaare bestimmt, die ein Intensitätsverhältnis zwischen  $\geq 0,8$  und  $\leq 1,2$  besaßen. Der ermittelte Anteil wurde als Referenzwert den Chargenvergleichen zugrunde gelegt. Aufgrund der Aufbereitung der Proben mithilfe von RP-SPE und RP-HPLC konnte gewährleistet werden, dass aus allen Proben mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließlich Peptide extrahiert wurden. Daher wurde der Referenz-

renzwert, der anhand einer Mobiforte®-Charge ermittelt worden war, auch für Vergleiche von KH-Präparaten anderer Hersteller verwendet.

### **2.2.7 Hauptversuch 3: Zelluläre Wirkung der KH-Präparate auf FLS**

Ziel dieses Hauptversuches war es zu untersuchen, ob erstens verschiedene KH-Präparate eine zelluläre Wirkung auf humane kultivierte FLS entfalten, zweitens eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung besitzen und drittens, ob sich verschiedene KH-Präparate bzw. Chargen eines KH-Präparates in ihrer zellulären Wirkung unterscheiden. Hierfür wurden zunächst mittels Enzym-Immuno-Assays (ELISA) bzw. Griess-Reaktion der Gehalt an verschiedenen Zytokinen sowie katabolen und anabolen Enzymen als auch den Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub> und NO im Nährmedium bestimmt und nach Normalisierung der ermittelten Konzentrationen mithilfe des jeweiligen zellulären Proteingehalts diese auf eine mögliche zelluläre Wirkung geprüft. Anschließend wurde verglichen, inwiefern sich die ermittelten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen verschiedener Chargen bzw. verschiedener KH-Präparate unterscheiden. Folgende KH-Präparate und -Chargen wurden hinsichtlich ihrer zellulären Wirkung auf humane kultivierte FLS untersucht:

- Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06),
- CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031),
- Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x),
- Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582).

#### **2.2.7.1 Freisetzung von Interleukinen**

Die Bestimmung des Gehalts von IL-1-β, IL-6 und IL-8 wurde mithilfe von ELISAs durchgeführt. Um auch gegebenenfalls nur in geringer Konzentration vorhandenes IL-1β bestimmen zu können, wurden für die Bestimmung von IL-1β in den Nährmedien verschieden sensitive ELISA-Verfahren verwendet. Die Testverfahren gehörten alle zu den Sandwich-ELISAs. Hierbei binden IL-spezifische, am Boden der 96-Mikrotiterplatten fixierte Antikörper an IL, die in den Nährmedien vorhanden sind. Ein weiterer, für das jeweilige IL spezifischer enzymgekoppelter Antikörper wird hinzugegeben und bindet zusätzlich an einem weiteren Epitop der IL. Nach mehrmaligem Waschen des Assays wird das Substrat hinzugegeben, welches durch das an die Antikörper

gebundene jeweilige Enzym katalytisch umgewandelt wird und zur Farbbildung führt. Die Farbintensität verhält sich proportional zum vorhandenen Gehalt an IL. Die endgültige Intensität der Farbe wird anschließend in einem ELISA-Platten-Photometer bei 450 nm bestimmt. Die Durchführung der Assays erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Bei dem IL-1 $\beta$ -Assay von invitrogen™ erfolgte zusätzlich vor der Bestimmung des Gehalts an IL eine fünffache Konzentrierung der Nährmedien mithilfe eines Zentrifugalfilters mit einer nominellen Molekulargewichtsgrenze (nominal molecular weight limit, engl. NMWL) von 3 kDa. Hierbei durchlaufen die Nährmedien einen Filter, während sie für die entsprechend gewünschte Konzentrierung für einen definierten Zeitraum mit spezifischer Drehzahl zentrifugiert werden. Die Aufkonzentrierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

	<b>IL-1<math>\beta</math> (R&amp;D Systems)</b>	<b>IL-1<math>\beta</math> (invitrogen™)</b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-8</b>
<b>Sensitivität</b>	< 1 pg/ml	1 pg/ml	0,03 pg/ml	1,5 -7,5 pg/ml
<b>Kreuzreaktivität (&gt; 1 %)</b>	Rekombinantes humanes Pro- IL-1 $\beta$ (6,1 %)	-	-	-
<b>Probenkonzentrierung</b>	einfach	fünffach	einfach	einfach

**Tab. 11:** Angaben zu ELISAs gemäß Hersteller.

### 2.2.7.2 Gehalt von Matrix-Metalloproteinasen

Der Gehalt von MMP-1, -3, -13 und Pro-MMP-13 in den Nährmedien wurde mithilfe von Enzym-Immunoassays bestimmt. Bei dem MMP-13-Assay erfolgte zusätzlich vor der Bestimmung eine dreifache Konzentrierung der Nährmedien, wie in 2.2.7.1 beschrieben. Die Testverfahren zählten ebenfalls zu den Sandwich-ELISAs und glichen im Aufbau den Testverfahren der IL-ELISAs, siehe 2.2.7.1. Die endgültige Intensität der Farbe wurde anschließend photometrisch bei 450 nm bestimmt. Die Durchführung der Assays erfolgte nach den Angaben der Hersteller.

	<b>MMP-1</b>	<b>MMP-3</b>	<b>Pro-MMP-13-</b>	<b>MMP-13</b>
<b>Sensitivität</b>	8 pg/ml	0,002 - 0,045 ng/ml	< 3,1 - 21,3 pg/ml	6 pg/ml
<b>Kreuzreaktivität (&gt; 1 %)</b>	-	-	-	-
<b>Probenkonzentrierung</b>	einfach	Einfach	einfach	dreifach

**Tab. 12:** Angaben zu ELISAs gemäß Hersteller.

### 2.2.7.3 Freisetzung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Die Freisetzung von TNF- $\alpha$  in die Nährmedien wurde mithilfe von zwei Enzym-Immuno-Assays unterschiedlicher Sensitivität untersucht. Zusätzlich erfolgte vor der Bestimmung des Gehalts bei dem Assay mit höherer Sensitivität (Human TNF- $\alpha$  Ultra Sensitive) eine fünffache Konzentrierung der Nährmedien, wie in 2.2.7.1 beschrieben. Die Testverfahren zählten ebenfalls zu den Sandwich-ELISAs und glichen im Aufbau den Testverfahren der IL-ELISAs, siehe 2.2.7.1. Die endgültige Intensität der Farbe wurde anschließend photometrisch bei 450 nm bestimmt. Die Durchführung der Assays erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

	<b>Human TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Human TNF-<math>\alpha</math> Ultra Sensitive</b>
<b>Sensitivität</b>	< 0,5-5,5 pg/ml	< 0,009 pg/ml
<b>Kreuzreaktivität (&gt; 1 %)</b>	-	-
<b>Probenkonzentrierung</b>	einfach	fünffach

**Tab. 13:** Angaben zu ELISAs gemäß Hersteller.

### 2.2.7.4 Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub>

*In vivo* wird Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) rasch mithilfe des Prostaglandin-15-Dehydrogenase-Signalwegs zu inaktiven Derivaten (15-keto-PGE<sub>2</sub>, 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub> und 13,14-dihydro-15-keto-PGA<sub>2</sub>) metabolisiert. Zur Bestimmung des PGE<sub>2</sub>-Gehaltes wurde daher ein Testverfahren verwendet, das alle PGE<sub>2</sub>-Metabolite in ein stabiles PGE<sub>2</sub>-Derivat überführt (Bicyclo-PGE<sub>2</sub>) und den Gehalt dieses stabilen Metaboliten misst. Bei dem verwendeten Testverfahren handelte es sich um einen kompetitiven Immunoassay: Hierbei konkurrieren das stabile PGE<sub>2</sub>-Derivat mit einem PGE<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Konjugat um PGE<sub>2</sub>-Antikörper, die den 96-Mikrotiterwells in gelöster Form hinzugegeben werden. Zusätzlich vorhandene Anti-IgG-Antikörper, die am

Grund der 96-Mikrotiter-Platten fixiert sind, binden die PGE<sub>2</sub>-Antikörper. Nach mehreren Waschschritten wird anschließend Ellman's-Reagenz, bestehend aus 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure und Acetylthiocholin, hinzugefügt. Dieses stellt das Substrat der Acetylcholinesterase dar und wird von dieser zu einem gelbfarbenen Produkt, das bei 420 nm photometrisch gemessen werden kann, umgewandelt. Die ermittelte Extinktion ist in inverser Form proportional zum PGE<sub>2</sub>-Gehalt der analysierten Proben. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die Sensitivität lag bei 15 pg/ml. Kreuzreaktivitäten von > 1 % konnten ermittelt werden für: PGE<sub>2</sub>-Ethanolamid (100 %), PGE<sub>2</sub>-1-glycerylester (100 %), PGE<sub>3</sub> (43 %), PGE<sub>1</sub> (18,7 %), 8-iso-PGE<sub>2</sub> (2,5 %) Sulprostone (1,25 %). 6-iso-PGF<sub>1α</sub> gemäß Angaben des Herstellers.

#### 2.2.7.5 Freisetzung von Stickstoffmonoxid

Da NO *in vivo* nur eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt, ist die direkte Bestimmung von NO nicht möglich. Um das Problem der kurzen Halbwertszeit von NO zu umgehen, kann jedoch anstelle von NO selbst der Gehalt indirekt mithilfe der stabileren NO-Metaboliten Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) bestimmt werden [29; 111]. Das ursprüngliche Verfahren dieser Methode geht zurück auf den Chemiker Peter Griess, der im 19. Jahrhundert in Marburg die Nitritbestimmung mittels Kolorimetrie durchführte. Nach diesem Verfahren reagiert Nitrit mit Sulfanilsäure/1-Naphtylamin zu einem Diazofarbstoff mit violetter Farbe [30], dessen Extinktion anschließend kolorimetrisch bestimmt werden kann. Zunächst wurde hierfür mithilfe von Nitratreduktase das in der Probe befindliche Nitrat in Nitrit umgewandelt. Dafür wurden 10 µl Nitratreduktase auf je 100 µl Probe Nährmedium gegeben. Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben in Duplikaten mit jeweils 50 µl auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und eine Standardreihe mit unterschiedlichen Nitrit-Konzentrationen, ebenfalls in Duplikaten, angesetzt. Die aufgetragenen Konzentrationen der Nitrit-Standardreihe betrugen 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 und 30 nM/ml. Zuletzt wurden den Proben jeweils 50 µl Griess-Reagenzlösung hinzugegeben und dann für fünf Minuten bei Raumtemperatur erneut inkubiert. Die quantitative Bestimmung mittels Extinktionsmessung erfolgte bei 520 nm in dem ELISA-Photometer. Der Extinktionswert des Mediums selbst wurde von den ermittelten Extinktionswerten der Proben subtrahiert. Von den resultierenden Werten der jeweils als Duplikat untersuchten Pro-

ben wurde das arithmetische Mittel gebildet und mithilfe der Standardkurve die entsprechende Nitrit-Konzentration bestimmt.

#### **2.2.7.6 Gehalt von TIMP-3**

Der Gehalt von TIMP-3 in den Nährmedien wurde mithilfe eines Enzym-Immuno-Assays ermittelt. Das Testverfahren zählte zu den Sandwich-ELISAs und glich im Aufbau den Testverfahren der IL-ELISAs (siehe 2.2.7.1). Die endgültige Intensität der Farbe wurde anschließend photometrisch bei 450 nm bestimmt. Die Durchführung der Assays erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Sensitivität betrug 62,50 pg/ml. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten angegeben.

#### **2.2.7.7 Vergleich der zellulären Wirkung von verschiedenen KH auf FLS**

Nach der Prüfung auf eine vorhandene zelluläre Wirkung der verschiedenen KH-Präparate bzw. Chargen erfolgte ein Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen. Ziel des Versuches war es zu ermitteln, ob sich verschiedene KH-Präparate bzw. Chargen in ihrer zellulären Wirkung auf FLS unterscheiden.

##### Erfolgte Vergleiche

- |  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| • CH-Alpha <sup>®</sup> , Chargen:     | LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031,      |
| • Mobiforte <sup>®</sup> , Chargen:    | LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06, |
| • Peptan <sup>®</sup> B 2000, Chargen: | LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x und    |
| Peptan <sup>®</sup> B 5000:            | LOT-Nr. 1247582                      |

## 2.3 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Messergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. J. Wilhelm aus der medizinischen Klinik II/IV der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie Dr. G. Eichner aus dem Mathematischen Institut der Justus-Liebig-Universität. Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft® Office 2010 (Word und Excel®), flexAnalysis Version 3.4 und GraphPad Prism® Version 5.03, eulerAPE Version 3.0.0 [65] sowie Citavi for Windows Version 5.4.0.2.

In den Vorversuchen „Vergleiche von Gesamtzahl und dem prozentualen Anteil der reproduzierbaren Peaks bei unterschiedlichen S/N“ (siehe 2.2.3.2) wurden die Gesamtzahl an Peaks bzw. die prozentualen Anteile an reproduzierbaren Peaks der drei Replikate eines KH-Präparates bei einem S/N von  $\geq 3$  und  $\geq 10$  bestimmt. Anschließend wurden daraus jeweils die Differenzen  $\Delta$  gebildet und mittels gepaarten t-Tests gegen 0 getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

In Hauptversuch 1 wurden in 2.2.5.1 zunächst die prozentualen Anteile, die die reproduzierbaren Peaks in den drei Replikaten eines KH-Präparates bei einem S/N von  $\geq 10$  ausmachten, bestimmt. Anschließend wurden diese mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Tests mit den entsprechenden prozentualen Anteilen eines anderen KH-Präparates verglichen. Zusätzlich wurden mittels ANOVA-one-way-Testung die prozentualen Anteile der Replikate aller KH-Präparate miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde in beiden Fällen auf  $\alpha = 0,05$  festgesetzt. Um zu überprüfen, ob sich verschiedene KH-Präparate bzw. Chargen in ihrer Zusammensetzung an Peptiden unterscheiden, wurde in 2.2.5.5 der prozentuale Anteil an reproduzierbaren Peaks bestimmt, der gemeinsam in allen zwei bzw. drei untersuchten KH-Präparaten auftrat. Anschließend wurde dieser mithilfe des Fisher's-exakter-Tests mit dem prozentualen Anteil an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks der entsprechenden Referenzmessung (siehe 2.2.5.4) verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgesetzt. Mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test für unabhängige Stichproben wurde außerdem geprüft, ob sich die Gesamtzahlen an Peaks der drei Replikate eines KH-Präparates signifikant ( $\alpha = 0,05$ ) von denen eines anderen KH-Präparates bzw. Charge unterscheiden. Um un-

erwünschte streuungsbedingte Effekte zu vermeiden, wurde die Testung mit den logarithmierten Werten der Gesamtzahlen an Peaks durchgeführt.

In Hauptversuch 2 wurden nach erfolgter Auswertung, gemäß 2.2.6.1, zunächst die jeweiligen, aus den drei Replikaten stammenden, zusammengehörigen Intensitätsverhältnisse eines Peakpaares mittels Dean-Dixon-Test ( $\alpha = 0,05$ ) auf Ausreißerwerte geprüft. Ausreißerwerte, in 14 von insgesamt 163 Fällen auftretend, waren biochemisch-physikalisch nicht erklärbar und wurden nicht in die weitere Auswertung miteinbezogen. Anschließend wurde aus den zusammengehörigen Intensitätsverhältnissen eines Peakpaares das arithmetische Mittel gebildet. Dieses wurde fortan für die weitere Prüfung verwendet. Um festzustellen, ob sich zwei Chargen eines KH-Präparates insgesamt in den Konzentrationen von gemeinsam vorhandenen Peptiden unterscheiden, wurde die Anzahl an ermittelten Peakpaaren, die ein Intensitätsverhältnis  $\geq 0,8$  und  $\leq 1,2$  besaßen, mit der Anzahl an Peakpaaren mit einem Intensitätsverhältnis zwischen  $\geq 0,8$  und  $\leq 1,2$  der in 2.2.6.3 erläuterten Referenzmessung verglichen.

Die Überprüfung erfolgte mittels Fisher's-exakter-Test bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ .

In Hauptversuch 3 (siehe 2.2.7) wurden die in Triplikaten ermittelten zellulären Proteingehalte mittels Dean-Dixon-Test bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  auf Ausreißerwerte geprüft und das arithmetische Mittel bestimmt. Ausreißerwerte, die in 28 von 252 Fällen auftraten, wurden nicht in die weitere Auswertung miteinbezogen. In 2.2.7.1 – 2.2.7.7 wurden verschiedene KH-Präparate und Chargen hinsichtlich eines stimulierenden Effekts im Sinne einer vermehrten Freisetzung von verschiedenen Zytokinen und Enzymen von FLS in die Nährmedien untersucht. Des Weiteren erfolgten Chargen- und Präparatvergleiche um zu überprüfen, ob sich diese in ihrer Wirkung auf das entsprechende Zytokin oder Enzym unterscheiden. In beiden Fällen wurde hierfür der zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ( $\alpha = 0,05$ ) eingesetzt. Die resultierenden p-Werte wurden anschließend für das multiple Testen gemäß der Bonferroni-Holms-Methode bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  adjustiert, um eine Alpha-fehler-Kumulierung zu vermeiden.



## 3 Ergebnisse

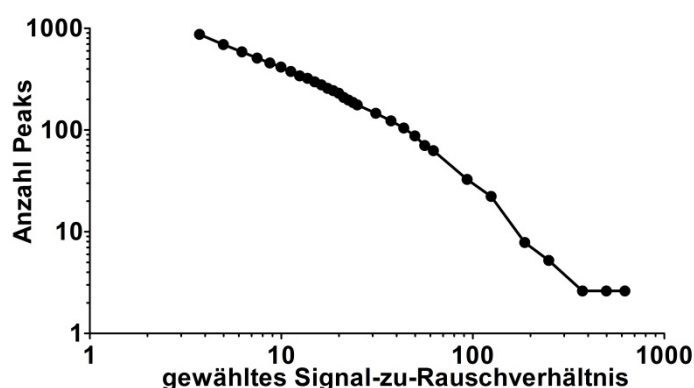
### 3.1 Vorversuche

#### 3.1.1 Vorversuche zur Wahl des S/N

Ziel der Vorversuche war es zu prüfen, ob sich ein optimales S/N ermitteln lässt, bei dem einerseits möglichst wenige Artefakte und andererseits möglichst viele Peaks im Massenspektrum erscheinen. Weiter sollte ermittelt werden, ob bei mit ICPL™-markierten KH ein anderes S/N als bei nichtmarkierten KH verwendet werden sollte.

##### 3.1.1.1 Prüfung auf das Vorhandensein eines optimalen S/N

Für die Untersuchung auf das Vorhandensein eines optimalen S/N wurde für jeweils ein Replikat der KH-Präparate CH-alpha® (LOT-Nr. L115/1031, L88/1031 und L170/1031), Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x), Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582), Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 1010903), Peptan® F 5000 (LOT-Nr. 101372) sowie Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06) ein Graph erstellt, der in der Ordinate das jeweilige S/N von  $\geq 3$  bis  $\geq 500$  und in der Abszisse die zum entsprechenden S/N zugehörige Anzahl an gefundenen Peaks im Massenspektrum abbildete. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, ob sich ein optimales S/N in Form eines sich auf den Kurven darstellenden Plateaus finden ließ. Bei keinem der untersuchten KH-Präparate fand sich ein markantes Plateau des Graphen. Exemplarisch wird in Abb. 4 der ermittelte Graph einer Mobiforte®-Charge gezeigt. Weitere Graphen werden im graphischen Anhang, Kapitel 12.1 dargestellt.



**Abb. 4:** Dargestellt wird die Anzahl der ermittelten Peaks in den MALDI-TOF-Massenspektren des KH-Präparates Mobiforte® (Replikat Nr. 1 LOT-Nr. 11/2016/L07) in Abhängigkeit von dem gewählten S/N.

### 3.1.1.2 Vergleiche von Gesamtzahl und prozentualen Anteilen der reproduzierbaren Peaks bei unterschiedlichen S/N

Bei der Prüfung auf Unterschiede in der Anzahl an ermittelten Peaks bei Verwendung von unterschiedlichen S/N, siehe 2.2.3.2, fand sich bei der Wahl eines S/N von  $\geq 3$  bei allen untersuchten Präparaten eine signifikant größere Anzahl an Peaks in den Replikaten als bei der Wahl eines S/N von  $\geq 10$ . Der p-Wert lag zwischen  $\leq 0,001$  (Mobiforte® LOT-Nr. 11/2016/L06) und 0,006 (CH-Alpha® LOT-Nr. L88/1031), siehe Tab. 14.

KH-Präparat	Anzahl Peaks in 3 Replikaten		p-Wert
	S/N $\geq 3$	S/N $\geq 10$	
Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 1010903)	407; 462; 373	115; 138; 122	0,005
Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07)	591; 678; 706	245; 288; 320	0,001
Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L06)	620; 550; 628	282; 221; 268	$\leq 0,001$
CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031)	494; 523; 527	170; 174; 165	0,0010
CH-Alpha® (LOT-Nr. L88/1031)	494; 523; 527	170; 174; 165	0,006

**Tab. 14:** Gesamtzahl der ermittelten Peaks in den drei Replikaten verschiedener KH-Präparate bei unterschiedlichen S/N

KH-Präparat	Prozentualer Anteil an reproduzierbaren Peaks in 3 Replikaten		p-Wert
	S/N $\geq 3$	S/N $\geq 10$	
Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 1010903)	49,4; 43,5; 53,9	71,3; 59,4; 67,2;	0,022
Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07)	56; 48,8; 46,9	59,6; 50,7; 45,6	$\geq 0,05$
Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L06)	61,8; 69,6; 61	58,9; 75,1; 61,9	$\geq 0,05$
CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031)	55,3; 52,2; 51,8	60,6; 59,2; 62,4	0,039
CH-Alpha® (LOT-Nr. L88/1031)	62,2; 47,7; 55,8	68,9; 53,3; 62	0,003

**Tab. 15:** Prozentuale Anteile an reproduzierbaren Peaks bei jeweils 3 Replikaten eines KH-Präparates in Abhängigkeit von unterschiedlichen S/N

Weiter sollte überprüft werden, ob sich Unterschiede in den prozentualen Anteilen an reproduzierbaren Peaks der verschiedenen KH-Präparate zeigen, wenn verschiedene S/N verwendet werden. Tab. 15 zeigt, dass der prozentuale Anteil an reproduzierbaren Peaks in den drei Replikaten bei einem S/N von  $\geq 10$  im Vergleich zu einem S/N von  $\geq 3$  entweder signifikant anstieg, so ermittelt bei Peptan® F 2000 LOT-Nr. 1010903 sowie CH-Alpha® LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031, oder aber gleich blieb, so ermittelt bei Mobiforte® LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06. In keinem der untersuchten Fälle sank der mittlere prozentuale Anteil an reproduzierbaren Peaks signifikant ab, wenn ein S/N von  $\geq 10$  anstelle eines S/N von  $\geq 3$  gewählt wurde.

### 3.1.2 Vorversuch Vergleich der Standardkurven von TIMP-3-ELISA in Nährmedium und „Reagent Diluent“

Ziel des Vorversuches war es zu prüfen, ob sich markante Unterschiede in den ermittelten Standardkurven ergeben, wenn die Standards einmal in dem mitgelieferten „Reagent Diluent“ und einmal in den Nährmedien der zu untersuchenden Proben angesetzt werden. Überprüft wurde dies, indem die ermittelten Standardkurven hinsichtlich ihrer errechneten Steigung und Achsenschnittpunkte miteinander verglichen wurden. Tab. 16 zeigt, dass der Vergleich der in Duplikaten angesetzten Standardkurve nur sehr geringe Unterschiede ergab.

	Standardkurve in Zellnährmedium	Standardkurve in „Reagent Diluent“
<b>Steigung</b>	$6,997 \cdot 10^{-4}$ (95 %-Konfidenzintervall: $6,6654 \cdot 10^{-4}$ bis $7,339 \cdot 10^{-4}$ )	$7,067 \cdot 10^{-4}$ (95 %-Konfidenzintervall: $6,771 \cdot 10^{-4}$ bis $7,363 \cdot 10^{-4}$ )
<b>Y-Achsen-Schnittpunkt für x = 0.0</b>	$1,624 \cdot 10^{-2}$ (95 %-Konfidenzintervall: $-3,968 \cdot 10^{-2}$ bis $7,215 \cdot 10^{-2}$ )	$-2,257 \cdot 10^{-2}$ (95 %-Konfidenzintervall: $-7,091 \cdot 10^{-2}$ bis $2,578 \cdot 10^{-2}$ )

**Tab. 16:** Vergleich beider TIMP-3-Standardkurven, die entweder im Nährmedium oder im mitgelieferten „Reagent Diluent“ verdünnt wurden.

## 3.2 Hauptversuche

### 3.2.1 Hauptversuch 1: Qualitativer Vergleich von KH-Präparaten

Untersucht wurde in diesem Hauptversuch, ob sich verschiedene KH-Präparate bzw. Chargen in ihrer jeweiligen Anzahl und in ihrer Zusammensetzung an reproduzierbaren Peaks unterscheiden. Eine Auflistung von allen ermittelten reproduzierbaren Peaks der verschiedenen KH-Präparate und Chargen findet sich im tabellarischen Anhang in 11.1.1. Um zu gewährleisten, dass verschiedene KH-Präparate bzw. Chargen miteinander vergleichbar sind, wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der Messmethode untersucht (siehe 3.2.2).

### 3.2.2 Hauptversuch 1: Reproduzierbarkeit der Messmethode

Die Reproduzierbarkeit der Messmethode wurde überprüft, indem untersucht wurde, ob sich der jeweilige prozentuale Anteil an reproduzierbaren Peaks in den Replikaten bei verschiedenen KH-Präparaten bzw. Chargen signifikant voneinander unterscheidet (siehe auch 2.2.5.1). Die Untersuchungen erfolgten bei einem S/N von  $\geq 10$ . Im Durchschnitt waren in den Replikaten der untersuchten KH-Präparate 59,6 % der Peaks reproduzierbar (vgl. Tab. 17). Bei keinem der untersuchten KH-Präparate zeigten sich signifikante Unterschiede in den prozentualen Anteilen an reproduzierbaren Peaks im Vergleich zu den anderen KH-Präparaten (Tab. 18).

KH-Präparat	Anteil an reproduzierbaren Peaks in den 3 Replikaten (in %)
Peptan <sup>®</sup> B 2000 (LOT-Nr. 1048665)	46,3; 58,3; 63,8
Peptan <sup>®</sup> B 2000 (LOT-Nr.1266793/x)	60,5; 70,8; 61,4
Peptan <sup>®</sup> B 5000 (LOT-Nr.1247582)	55,3; 54,8; 51,1
Peptan <sup>®</sup> F 5000 (LOT-Nr. 101372)	66,7; 55,4; 51,1
Peptan <sup>®</sup> F 2000 (LOT-Nr. 1010903)	71,3; 59,4; 67,2
Mobiforte <sup>®</sup> (LOT-Nr. 11/2016/L07)	59,6; 50,7; 45,5
Mobiforte <sup>®</sup> (LOT-Nr. 11/2016/L06)	58,9; 75,1; 61,9
CH-Alpha <sup>®</sup> (LOT-Nr. L115/1031)	60,6; 59,2; 62,4
CH-Alpha <sup>®</sup> (LOT-Nr. L88/1031)	68,9; 53,3; 62,1
CH-Alpha <sup>®</sup> (LOT-Nr. L170/1031)	55,8; 56,1; 63,6

**Tab. 17:** Prozentualer Anteil der reproduzierbaren Peaks pro Replikat bei verschiedenen KH-Präparaten. Das gewählte S/N betrug  $\geq 10$ .

Erfolgte Vergleiche von KH-Präparaten und –Chargen	
Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 1010903) 71,3 %; 59,4 %; 67,2 %	Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) 59,6 %; 50,7 %; 45,5 %
Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) 59,6 %; 50,7 %; 45,5 %	Mobiforte® (LOT-Nr. 1/2016/L06) 58,9 %; 75,1 %; 61,9 %
Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) 59,6 %; 50,7 %; 45,5 %	CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031) 60,6 %; 59,2 %; 62,4 %
Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) 59,6 %; 50,7 %; 45,5 %	Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) 55,3 %; 54,8 %; 51,1 %
Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) 59,6 %; 50,7 %; 45,5 %	Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) 46,3 %; 58,3 %; 63,8 %
Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) 59,6 %; 50,7 %; 45,5 %	Peptan® F 5000 (LOT-Nr. 101372) 66,7 %; 55,4 %; 51,1 %
CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031) 60,6 %; 59,2 %; 62,4 %	CH-Alpha® (LOT-Nr. L88/1031) 68,9 %; 53,3 %; 62,1 %
CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031) 60,6 %; 59,2 %; 62,4 %	CH-Alpha® (LOT-Nr. L170/1031) 55,8 %; 56,1 %; 63,6 %
CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031) 60,6 %; 59,2 %; 62,4 %	Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) 46,3 %; 58,3 %; 63,8 %
CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031) 60,6 %; 59,2 %; 62,4 %	CH-Alpha® (LOT-Nr. L170/1031) 55,8 %; 56,1 %; 63,6 %
CH-Alpha® (LOT-Nr. L88/1031) 68,9 %; 53,3 %; 62,1 %	Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) 46,3 %; 58,3 %; 63,8 %
Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) (46,3 %; 58,3 %; 63,8 %)	Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1266793/x) 60,5 %; 70,8 %; 61,4 %
Vergleich aller o. g. KH-Präparate miteinander mittels ANOVA-Testung	

**Tab. 18:** Vergleich der prozentualen Anteile der reproduzierbaren Peaks von verschiedenen KH-Präparaten und -Chargen. Die p-Werte lagen bei allen ange-stellten Vergleichen bei  $\geq 0,05$ .

### 3.2.3 Hauptversuch 1: Vergleich von zwei oder drei KH-Präparaten

Um festzustellen, ob sich verschiedene KH-Präparate bzw. Chargen voneinander unter-scheiden, wurden erstens die Gesamtzahlen an Peaks miteinander verglichen (siehe 2.2.5.5). Zweitens wurde überprüft, ob sich die verschiedenen KH in ihrer Zusammen-setzung unterscheiden. Dazu wurde ermittelt, wie groß der prozentuale Anteil all derje-nigen reproduzierbaren Peaks ist, die gemeinsam in den zu vergleichenden KH-Präparaten vorkommen (bezogen auf alle vorhandenen reproduzierbaren Peaks der zu untersuchenden KH-Präparate). Der ermittelte prozentuale Anteil wurde anschließend mit dem dazugehörigen Referenzwert (siehe 2.2.5.4) verglichen. Aus Platzgründen kön-nen auch im tabellarischen Anhang nicht alle erfolgten Vergleiche in vollem Umfang

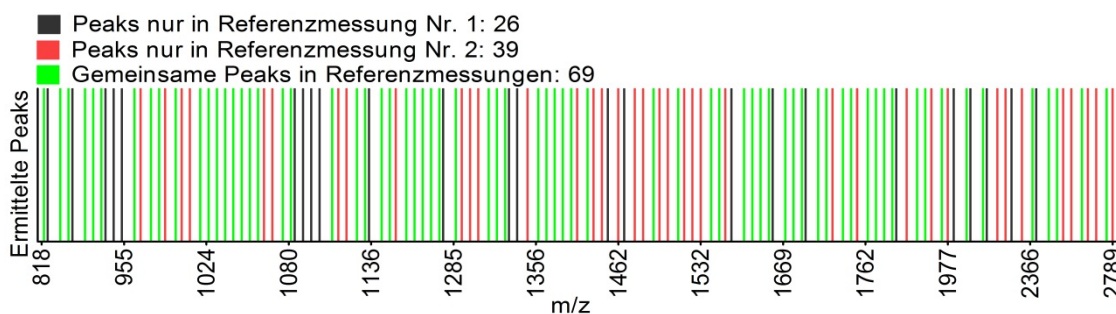
dargestellt werden. Exemplarisch werden in Kapitel 11.1.2 daher der Referenzvergleich Nr. 1 sowie der KH-Präparatvergleich von Mobiforte® und Peptan® B 2000 gezeigt.

### **3.2.3.1 Ergebnis Referenzmessungen**

Zur Ermittlung der beiden Referenzwerte Nr. 1 und Nr. 2 wurden zwei Referenzvergleiche durchgeführt: Hierfür wurde die Charge LOT-Nr. L170/1031 des KH-Präparates CH-Alpha® an drei verschiedenen Tagen mittels MALDI-TOF-MS untersucht. An jedem Tag wurden anschließend die jeweiligen reproduzierbaren Peaks aus den Replikaten bestimmt. Die dazugehörigen Peaklisten werden in Kapitel 11.1.1, Tab. 1 dargestellt. Für Referenzvergleich Nr. 1 wurden zwei Messungen der CH-Alpha®-Charge miteinander verglichen. Der Referenzwert Nr. 1 gab den prozentualen Anteil an, den die gemeinsamen, in beiden Messungen vorhandenen reproduzierbaren Peaks bezogen auf alle Peaks ausmachten und wurde den Vergleichen von zwei KH-Präparaten bzw. Chargen zugrundegelegt. Für Referenzvergleich Nr. 2 wurden alle drei Messungen der CH-Alpha®-Charge miteinander verglichen. Der Referenzwert Nr. 2 gab folglich den prozentualen Anteil an, den die gemeinsamen, in allen drei Messungen vorhandenen reproduzierbaren Peaks bezogen auf alle Peaks ausmachten und wurde den Vergleichen von drei KH-Präparaten bzw. Chargen zugrundegelegt (siehe auch Kapitel 2.2.5.4).

#### Referenzvergleich Nr. 1

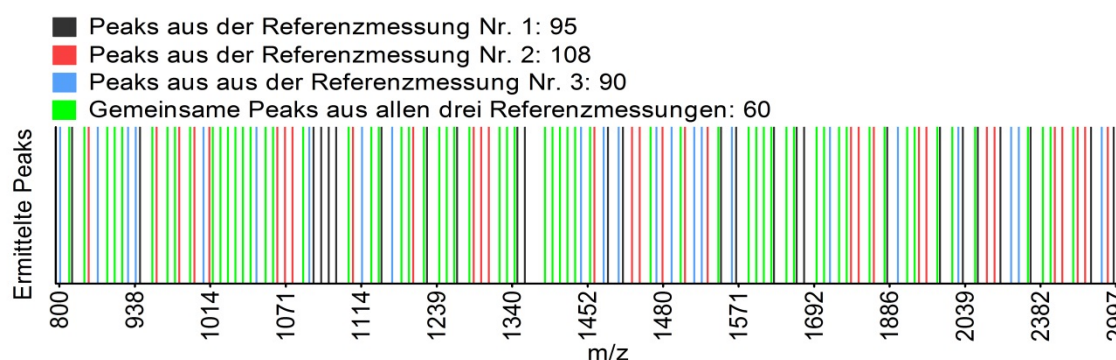
Bei dem erfolgten Referenzvergleich Nr. 1 fanden sich in der untersuchten CH-Alpha®-Charge in der ersten Messung 95 reproduzierbare Peaks und in der zweiten Messung 108 reproduzierbare Peaks, siehe auch Kapitel 11.1.1, Tab. 1. 69 reproduzierbare Peaks konnten in beiden Messungen nachgewiesen werden, siehe Abb. 5. Bezogen auf die Gesamtzahl an reproduzierbaren Peaks entsprach dies 51 %. Eine ausführliche tabellarische Darstellung des Referenzvergleiches Nr. 1 findet sich in Kapitel 11.1.2 in Tab. 1.



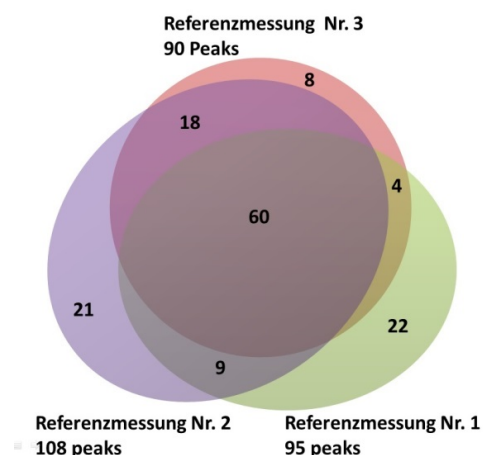
**Abb. 5:** Dargestellt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks des Referenzvergleichs Nr. 1 (Messung des KH-Präparates CH-alpha® Lot-Nr. L170/1031 an zwei verschiedenen Tagen) mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ) in einem Gel-like-view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welcher Messung ein Peak auftrat. Trat ein Peak in allen beiden Messungen gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl eines jeden zehnten Peaks gezeigt.

### Referenzvergleich Nr. 2

Bei dem erfolgten Referenzvergleich Nr. 2 fanden sich zusätzlich zu den 95 reproduzierbaren Peaks in der ersten und den 108 reproduzierbaren Peaks in der zweiten Messung 90 reproduzierbare Peaks in der dritten Messung (siehe auch Kapitel 11.1.1, Tab. 1). Es wurden insgesamt 60 reproduzierbare Peaks ermittelt, die in allen drei Messungen gemeinsam vorkamen (Abb. 6 und 7). Bezogen auf die Gesamtzahl an reproduzierbaren Peaks entsprach dies 42 %.



**Abb. 6:** Dargestellt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks des Referenzvergleichs Nr. 2, CH-Alpha® LOT-Nr. L170/1031, gemessen an drei verschiedenen Tagen mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ) in einem Gel-like-view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welcher Messung ein Peak auftrat. Trat ein Peak in allen Referenzmessungen gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl eines jeden zehnten Peaks gezeigt. Es wurde darauf verzichtet, Peaks, die nur in zwei von drei untersuchten KH-Präparaten gemeinsam auftreten, gesondert zu kennzeichnen.

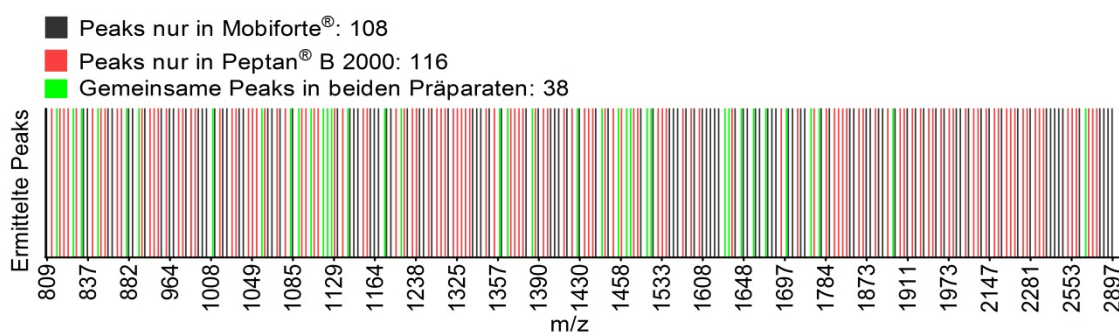


**Abb. 7:** Dargestellt werden die gemeinsamen Peaks der drei Referenzmessungen Nr. 1, 2 und 3 in einem Venn-Diagramm. Die Zahlen außerhalb der Abbildung zeigen die Gesamtzahl an Peaks in der jeweiligen Referenzmessung. Die Zahlen in den überlappenden Flächen geben die jeweilige Anzahl an gemeinsamen Peaks an.

### 3.2.3.2 Ergebnis Vergleich von KH-Präparaten unterschiedlicher Hersteller

#### Vergleich von Mobiforte® und Peptan® B 2000

Beim Vergleich von Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) und Peptan® B 2000 Charge (LOT-Nr. 1048665) fanden sich 146 reproduzierbare Peaks bei Mobiforte® und 154 reproduzierbare Peaks bei Peptan® B 2000 (siehe auch Kapitel 11.1.1, Tab. 3 und 4). Abb. 8 zeigt, dass 38 Peaks in beiden KH-Präparaten gemeinsam vorkamen; dies entsprach bezogen auf die Gesamtzahl an reproduzierbaren Peaks 15 %. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich der Gesamtzahl an Peaks der beiden KH-Präparate gezeigt werden. Der Vergleich des prozentualen Anteils an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks der beiden KH-Präparate mit dem Referenzwert Nr. 1 (= 51 %) wies dagegen einen statistisch signifikanten Unterschied auf ( $p < 0,0001$ ). Eine



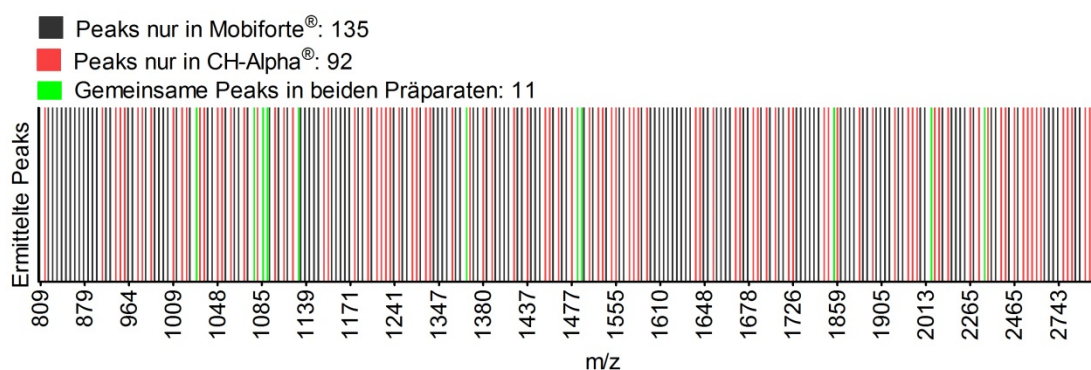
**Abb. 8:** Dargestellt wird der Vergleich der Präparate von Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) und Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665). Gezeigt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks mit ihrer jeweiligen Massenzahl (m/z) in einem Gel-like-view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welchem KH-Präparat ein Peak auftrat. Trat ein Peak in allen KH-Präparaten gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl eines jeden zehnten Peaks gezeigt.



tabellarische Darstellung des Präparatevergleichs findet sich im tabellarischen Anhang (siehe Kapitel 11.1.2, Tab. 2).

#### Vergleich von Mobiforte® und CH-Alpha®

Beim Vergleich von Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) und CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031) fanden sich 146 reproduzierbare Peaks bei Mobiforte® und 103 reproduzierbare Peaks bei CH-Alpha® (siehe auch Kapitel 11.1.1, Tab. 2 und 4). Abb. 9 zeigt, dass 11 reproduzierbare Peaks ermittelt wurden, die in beiden KH-Präparaten gemeinsam vorkamen. Dies entsprach bezogen auf die Gesamtzahl an reproduzierbaren Peaks 5 %. Beim Vergleich der Gesamtzahl an Peaks beider KH-Präparate zeigten sich signifikante Unterschiede ( $p = 0,003$ ). Auch der Vergleich des prozentualen Anteils an gemeinsamen Peaks mit dem Referenzwert Nr. 1 (= 51 %) wies einen statistisch signifikanten Unterschied auf ( $p < 0,0001$ ).

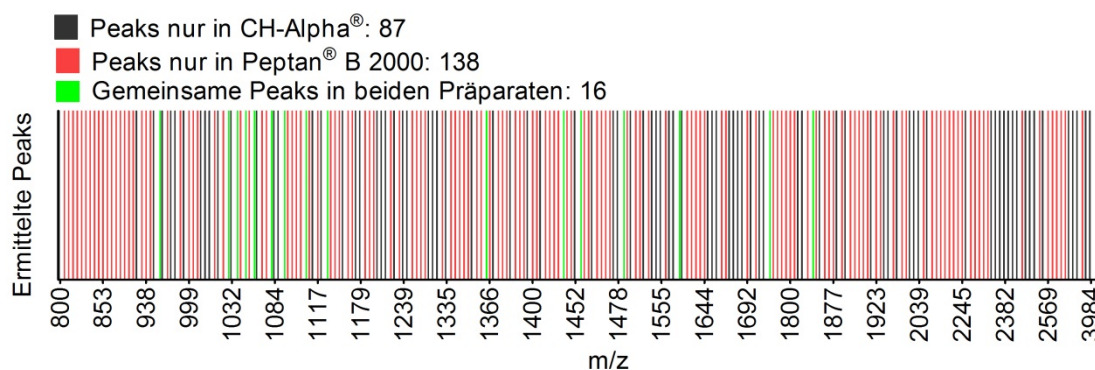


**Abb. 9:** Dargestellt wird der KH-Vergleich von Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) und CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031). Gezeigt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ) in einem Gel-like-view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welchem KH-Präparat ein Peak auftrat. Trat ein Peak in beiden KH-Präparaten gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl eines jeden zehnten Peaks gezeigt.

#### Vergleich von CH-Alpha® und Peptan® B 2000

Beim Vergleich von CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031) und Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) fanden sich 103 reproduzierbare Peaks bei CH-Alpha® und 154 reproduzierbare Peaks bei Peptan® B 2000 (siehe auch Kapitel 11.1.1, Tab. 2 und 3). Abb. 10 zeigt, dass 16 reproduzierbare Peaks ermittelt werden konnten, die in beiden KH-Präparaten gemeinsam vorkamen; dies entsprach bezogen auf die Gesamtzahl an reproduzierbaren

Peaks 7 %. Beim Vergleich der Gesamtzahl an Peaks der beiden KH-Präparate zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede ( $p = 0,007$ ). Auch beim Vergleich des prozentualen Anteils an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks der beiden KH-Präparate mit dem Referenzwert Nr. 1 (= 51 %) konnte ein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden ( $p < 0,001$ ).

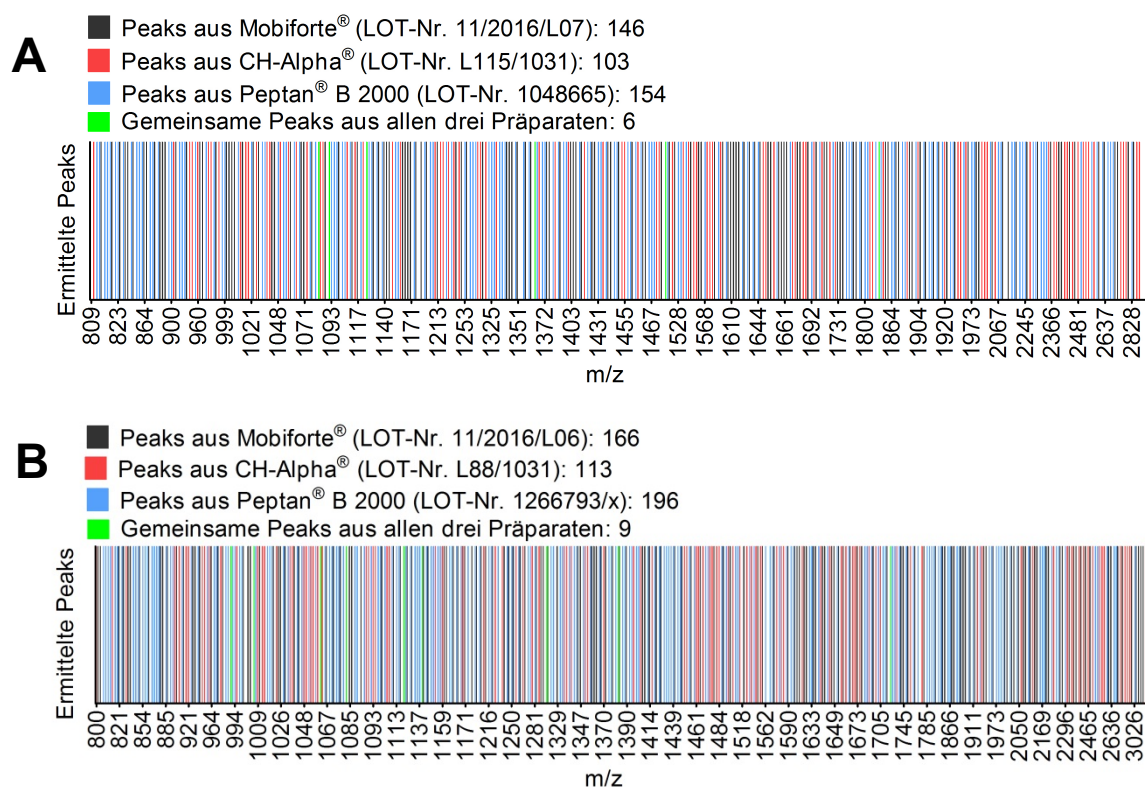


**Abb. 10:** Dargestellt wird der KH-Vergleich von CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031) und Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665). Gezeigt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ) in einem Gel-like-view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welchem KH-Präparat ein Peak auftrat. Trat ein Peak in allen KH-Präparaten gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl eines jeden zehnten Peaks gezeigt.

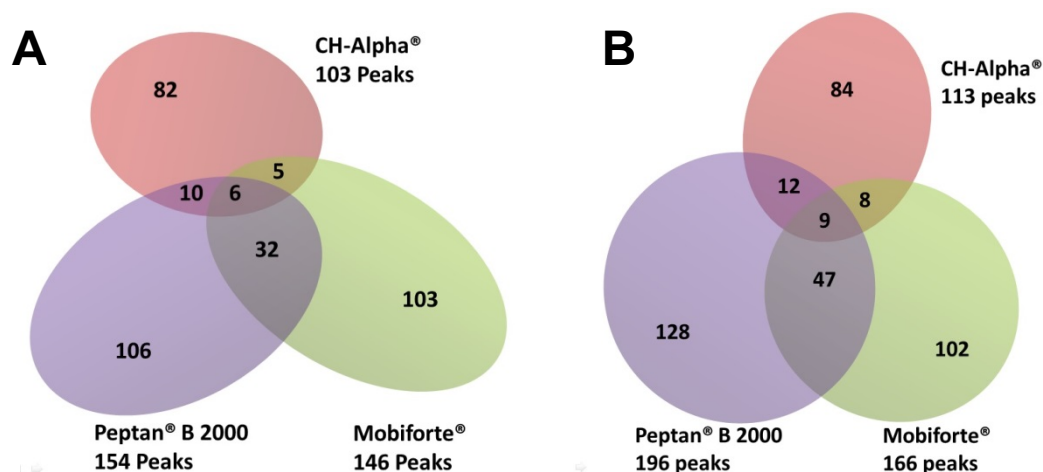
#### Gemeinsamer Vergleich von Mobiforte®, Peptan® B 2000 und CH-Alpha®

Zusätzlich zum Vergleich von jeweils zwei der oben aufgeführten KH-Präparate miteinander erfolgte ein Vergleich aller drei KH-Präparate Mobiforte®, Peptan® B 2000 und CH-Alpha® zusammen in doppelter Ausführung: Verglichen wurden (A) die Chargen CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031), Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) und Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) sowie (B) die Chargen CH-Alpha® (LOT-Nr. L88/1031), Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1266793/x) und Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L06). Bei den Vergleichen zeigten sich ähnliche Ergebnisse: So fanden sich bei Vergleich (A) bei Peptan® B 2000 154 reproduzierbare Peaks, bei CH-Alpha® 103 reproduzierbare Peaks und bei Mobiforte® 146 reproduzierbare Peaks. Bei Vergleich (B) konnten bei Peptan® B 2000 196 reproduzierbare Peaks, bei CH-Alpha® 113 reproduzierbare Peaks und bei Mobiforte® 166 reproduzierbare Peaks ermittelt werden (siehe auch Kapitel 11.1.1, Tab. 2, 3 und 4.). An gemeinsamen reproduzierbaren Peaks, die in allen drei KH-Präparaten jeweils gemeinsam vorkamen, konnten bei Vergleich (A) nur 6 reproduzier-

bare Peaks ermittelt werden und bei Vergleich (B) nur 9 reproduzierbare Peaks (siehe Abb. 11 und 12). Dies entsprach bezogen auf die jeweilige Gesamtzahl an reproduzierbaren Peaks jeweils 2 %. Sowohl bei Vergleich Nr. 1 als auch bei Vergleich Nr. 2 zeigten sich signifikante Unterschiede in der Anzahl an gemeinsamen Peaks in Bezug zur Referenzmessung Nr. 2 (= 42 %). Der p-Wert lag bei beiden Vergleichen  $< 0,001$ .



**Abb. 11:** Dargestellt werden die Präparatvergleiche (A) und (B) von Mobiforte®, CH-Alpha® und Peptan® B 2000, die mit unterschiedlichen Chargen erfolgten. Gezeigt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ) in einem Gel-like-view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welchem KH-Präparat ein Peak auftritt. Trat ein Peak in allen KH-Präparaten gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert, etc. Zugunsten der Übersichtlichkeit werden in den Diagrammen nur die Massenzahlen eines jeden zehnten Peaks gezeigt. Es wurde darauf verzichtet, Peaks, die nur in zwei von drei untersuchten KH-Präparaten gemeinsam auftreten, gesondert zu kennzeichnen.

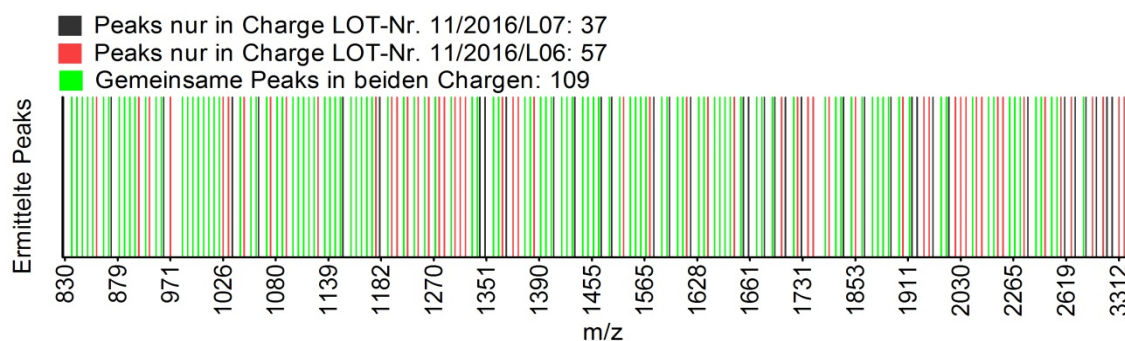


**Abb. 12:** Dargestellt werden die gemeinsamen Peaks von Mobiforte®, CH-Alpha® und Peptan® B 2000 in einem Venn-Diagramm. Die Zahlen außerhalb der Abbildung geben die Gesamtzahl an Peaks des jeweiligen KH-Präparates an, die Zahlen in den überlappenden Flächen zeigen die jeweilige Anzahl an gemeinsamen Peaks an. Verwendete Chargen (A): CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031), Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) und Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07); (B) CH-Alpha® (LOT-Nr. L88/1031), Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1266793/x) und Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L06).

### 3.2.3.3 Ergebnis Chargenvergleiche von KH-Präparaten

#### Chargenvergleich Mobiforte®

Beim Vergleich der beiden untersuchten Mobiforte®-Chargen (LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06) wurden bei der erstgenannten Charge 146 reproduzierbare Peaks ermittelt, bei der zweitgenannten 166 (siehe auch Kapitel 11.1.1, Tab. 4). Abb. 13 zeigt, dass sich 109 reproduzierbare Peaks in beiden Chargen wiederfanden; dies entsprach

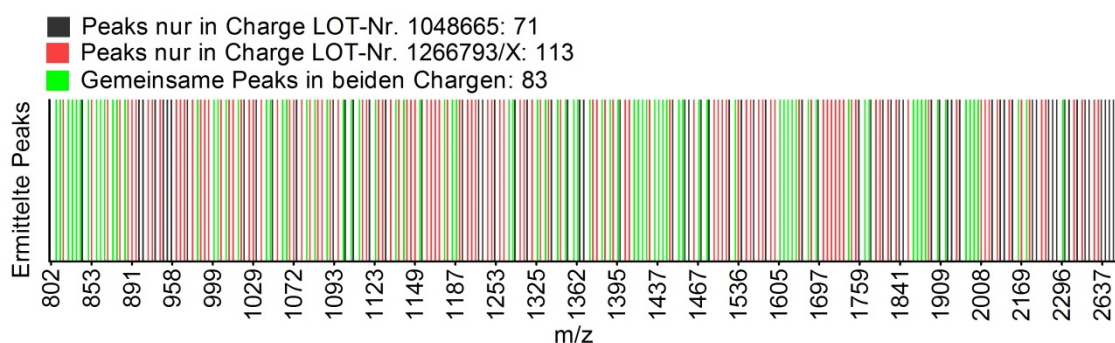


**Abb. 13:** Dargestellt wird der Chargenvergleich von Mobiforte®. Gezeigt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ) in einem Gel-like-view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welcher Charge ein Peak auftrat. Trat ein Peak beiden Chargen gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl eines jeden zehnten Peaks gezeigt.

bezogen auf die Gesamtzahl an reproduzierbaren Peaks 54 %. Weder beim Vergleich der Anzahl an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks mit dem Referenzwert Nr. 1 (= 51 %) noch beim Vergleich der Gesamtzahl an Peaks der beiden Chargen miteinander zeigten sich signifikante Unterschiede.

#### Chargenvergleich Peptan® B 2000

Beim Vergleich der beiden Chargen des KH-Präparates Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x) fanden sich bei der erstaufgeführten Charge 155 reproduzierbare Peaks, bei der zweitgenannten Charge 196 reproduzierbare Peaks (siehe auch Kapitel 11.1.1, Tab. 3). Die Anzahl an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks in beiden Präparaten betrug 83 (Abb. 14). Bezogen auf die Gesamtzahl an reproduzierbaren Peaks entsprach dies 31 %. Beim Vergleich der Gesamtzahl an Peaks zeigten sich bei den beiden Chargen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Beim Vergleich des prozentualen Anteils an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks der beiden Chargen mit dem Referenzwert Nr. 1 (= 51 %) fand sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,006$ ).



**Abb. 14:** Dargestellt wird der Chargenvergleich von Peptan® B 2000. Gezeigt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ) in einem Gel-like-view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welcher Charge ein Peak auftrat. Trat ein Peak in beiden Chargen gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl eines jeden zehnten Peaks gezeigt.

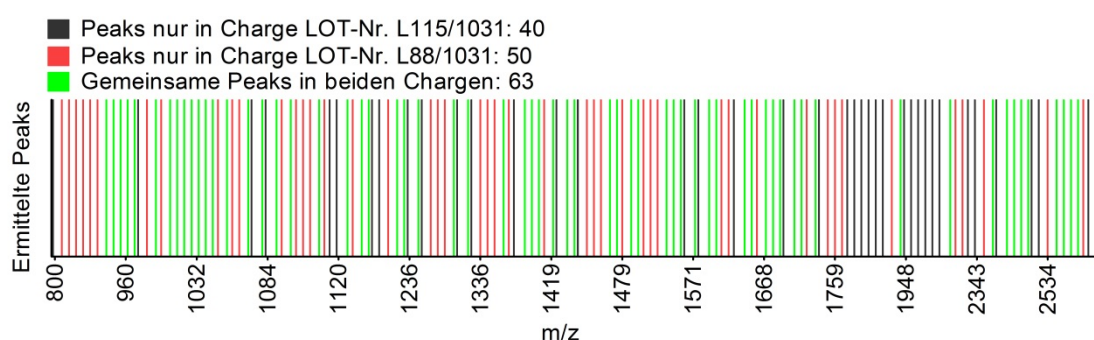
#### Chargenvergleiche CH-Alpha®

Bei den Chargenvergleichen des KH-Präparates CH-Alpha® wurden drei verschiedene Chargen (LOT-Nr. L115/1031, L88/1031 und L170/1031) untersucht. Es erfolgten sowohl mehrere Vergleiche von zwei Chargen miteinander als auch der Vergleich von

allen drei o. g. Chargen zusammen. Exemplarisch soll hier der Chargenvergleich von LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031 sowie der Vergleich aller drei Chargen zusammen dargestellt werden. Weitere Ergebnisse erfolgter Vergleiche werden in Tab. 19 zusammengefasst.

#### Vergleiche von zwei CH-Alpha®-Chargen

Beim Vergleich der beiden CH-Alpha®-Chargen LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031 zeigten sich bei erstgenannter Charge 103 reproduzierbare Peaks und bei der zweitgenannten Charge 113 reproduzierbare Peaks (siehe auch Kapitel 11.1.1, Tab. 2). Abb. 15 zeigt, dass sich 63 reproduzierbare Peaks fanden, die in beiden Chargen gemeinsam auftraten. Bezogen auf die Gesamtzahl an reproduzierbaren Peaks entsprach dies 41 %. Beim Vergleich der Gesamtzahl an Peaks der beiden Chargen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. Auch beim Vergleich des prozentualen Anteils an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks der beiden Chargen mit dem Referenzwert Nr. 1 (= 51 %) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Bei allen weiteren erfolgten Vergleichen von zwei CH-Alpha®-Chargen konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden, weder beim Vergleich der Gesamtzahl an Peaks noch beim Vergleich des prozentualen Anteils an gemeinsamen Peaks mit dem Referenzwert Nr. 1 (Tab. 19). Die Vergleiche werden in Kapitel 12.2 in Abb. 1 und 2 graphisch dargestellt. Die dazugehörigen Peaklisten der Chargen finden sich in Kapitel 11.1.1, Tab. 1 und 2.



**Abb. 15:** Dargestellt wird der Chargenvergleich von zwei CH-Alpha®-Chargen. Gezeigt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ) in einem Gel-like-view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welchem KH-Präparat ein Peak auftrat. Trat ein Peak in beiden Chargen gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl eines jeden zehnten Peaks gezeigt.

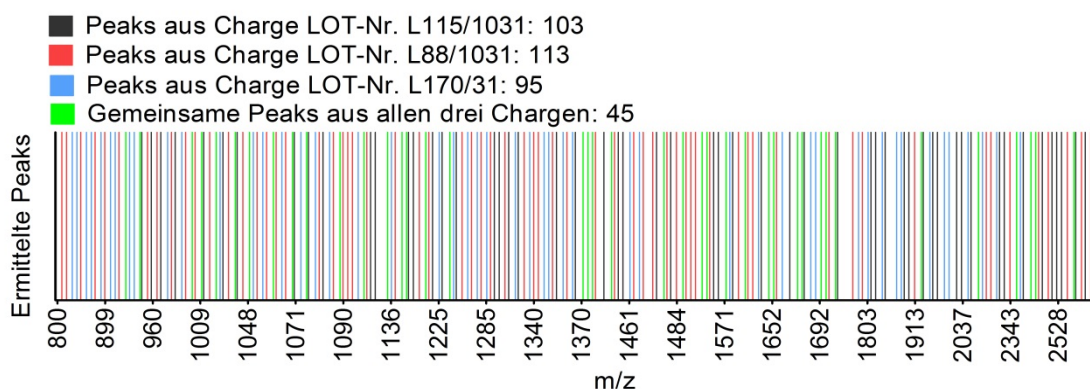


CH-Alpha® LOT-Nr.	Anzahl Peaks	Gemeinsame Peaks	Unterschied Anzahl Peaks	Unterschied Anteil gemeinsame Peaks*
L88/1031	113	62 (= 42 % bezogen auf alle Peaks)	$p \geq 0,05$	$p \geq 0,05$
L170/1031	95			
L115/1031	103	54 (= 38 % bezogen auf alle Peaks)	$p \geq 0,05$	$p \geq 0,05$
L170/1031	95			

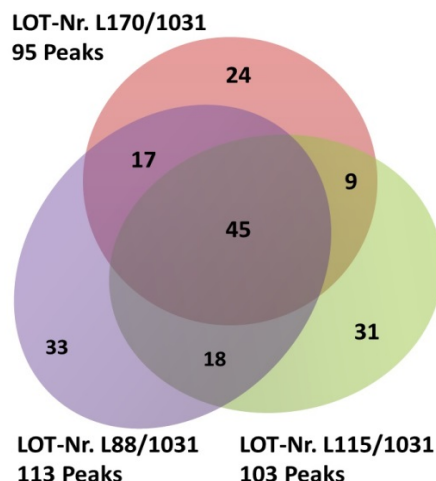
**Tab. 19:** Darstellung weiterer Chargenvergleiche von CH-Alpha®. Gezeigt werden die Anzahl an reproduzierbaren Peaks der jeweiligen Charge und die Anzahl an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks des zugrundeliegenden Vergleiches. Weiter wird gezeigt, ob sich die verglichenen Chargen in ihrer Gesamtzahl an Peaks und in dem jeweiligen prozentualen Anteil an reproduzierbaren Peaks, die gemeinsam in beiden Chargen vorkommen, von dem Referenzwert Nr. 1 (= 51 %) statistisch signifikant unterscheiden (p-Wert).

#### Vergleich von drei CH-Alpha®-Chargen:

Beim Vergleich der drei CH-Alpha®-Chargen miteinander fanden sich bei der ersten Charge (LOT-Nr. L115/1031) 103 reproduzierbare Peaks, bei der zweiten (LOT-Nr. L88/1031) 113 reproduzierbare Peaks und bei der dritten Charge (LOT-Nr. L170/1031) 95 reproduzierbare Peaks (siehe auch Kapitel 11.1.1, Tab. 1 und 2). Die Anzahl an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks betrug 45 (Abb. 16 und 17). Bezogen auf die Gesamtzahl an reproduzierbaren Peaks entsprach dies 25 %. Beim Vergleich des prozentualen Anteils mit dem Referenzwert Nr. 2 (= 42 %) zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,016$ ).



**Abb. 16:** Dargestellt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks von drei CH-Alpha®-Chargen mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ) in einem Gel-like-view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welcher Messung ein Peak vorkommt. Tritt ein Peak in allen Referenzmessungen gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl eines jeden zehnten Peaks gezeigt. Es wurde darauf verzichtet, Peaks, die nur in zwei von drei untersuchten KH-Präparaten gemeinsam auftreten, zu kennzeichnen.



**Abb. 17:** Dargestellt werden die gemeinsamen Peaks des Vergleichs von drei CH-Alpha®-Chargen. Die Zahlen außerhalb der Abbildung zeigen die Gesamtzahl an Peaks in der jeweiligen Charge. Die Zahlen in den überlappenden Flächen geben die jeweilige Anzahl an gemeinsamen Peaks an.

#### 3.2.3.4 Ergebnis Vergleich verschiedener KH-Präparate von Rousselot

Nachfolgend werden in Kürze die Ergebnisse der Vergleiche von

- Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 101903) und Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665)
- Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 101903) und Peptan® F 5000 (LOT-Nr. 101372)
- Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) und Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) und
- Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) und Peptan® F 5000 (LOT-Nr. 101372)

in tabellarischer Form dargestellt (Tab. 20). Während sich die Präparate Peptan® F 2000 und Peptan® F 5000 sowie Peptan® B 5000 und Peptan® F 5000 nicht statistisch signifikant in ihrer Gesamtzahl an Peaks unterschieden, fanden sich beim Vergleich von Peptan® F 2000 und Peptan® B 2000 sowie bei Peptan® B 2000 und Peptan® B 5000 hier statistisch signifikante Unterschiede. Bei allen angestellten Vergleichen unterschieden sich die prozentualen Anteile an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks statistisch signifikant von dem Referenzwert Nr. 1. Die dazugehörigen Gel-like-view-Diagramme finden sich im graphischen Anhang (Kapitel 12.2, Abb. 3 - 6). Die Peaklisten der jeweiligen Präparate werden im tabellarischen Anhang dargestellt (Kapitel 11.1.1, Tab. 2 - 4).



KH-Präparate	Anzahl Peaks	Gemeinsame Peaks	Unterschied Anzahl Peaks	Unterschied Anteil gemeinsame Peaks
Peptan <sup>®</sup> F 2000	82	9 ( $\cong$ 4 %)	p = 0,002	p $\leq$ 0,001
Peptan <sup>®</sup> B 2000	154			
Peptan <sup>®</sup> F 2000	82	6 ( $\cong$ 4 %)	p $\geq$ 0,05	p $\leq$ 0,001
Peptan <sup>®</sup> F 5000	72			
Peptan <sup>®</sup> B 2000	154	29 ( $\cong$ 15 %)	p = 0,0013	p $\leq$ 0,001
Peptan <sup>®</sup> B 5000	68			
Peptan <sup>®</sup> B 5000	68	2 ( $\cong$ 1 %)	p $\geq$ 0,05	p $\leq$ 0,001
Peptan <sup>®</sup> F 5000	72			

**Tab. 20:** Vergleich der Präparate des Herstellers Rousselot. Gezeigt werden die Anzahl an reproduzierbaren Peaks des jeweiligen KH-Präparates und die Anzahl an gemeinsamen reproduzierbaren Peaks des zugrundeliegenden Vergleiches. Weiter wird gezeigt, ob sich die verglichenen Chargen in ihrer Gesamtzahl an Peaks und in dem jeweiligen prozentualen Anteil an reproduzierbaren Peaks, die gemeinsam in beiden Chargen vorkommen, von dem Referenzwert Nr. 1 (= 51 %) statistisch signifikant unterscheiden (p-Wert).

### 3.2.4 Hauptversuch 2: Quantitativer Chargenvergleich mittels ICPL™

Ziel dieses Hauptversuches war es zu überprüfen, ob sich die Konzentrationen von gemeinsam vorhandenen KH-Peptiden bei zwei unterschiedlichen Chargen eines KH-Präparates unterscheiden. Dies wurde, wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, mittels ICPL™-Markierung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.2.6.1 skizziert.

#### 3.2.4.1 Ergebnis Referenzmessung

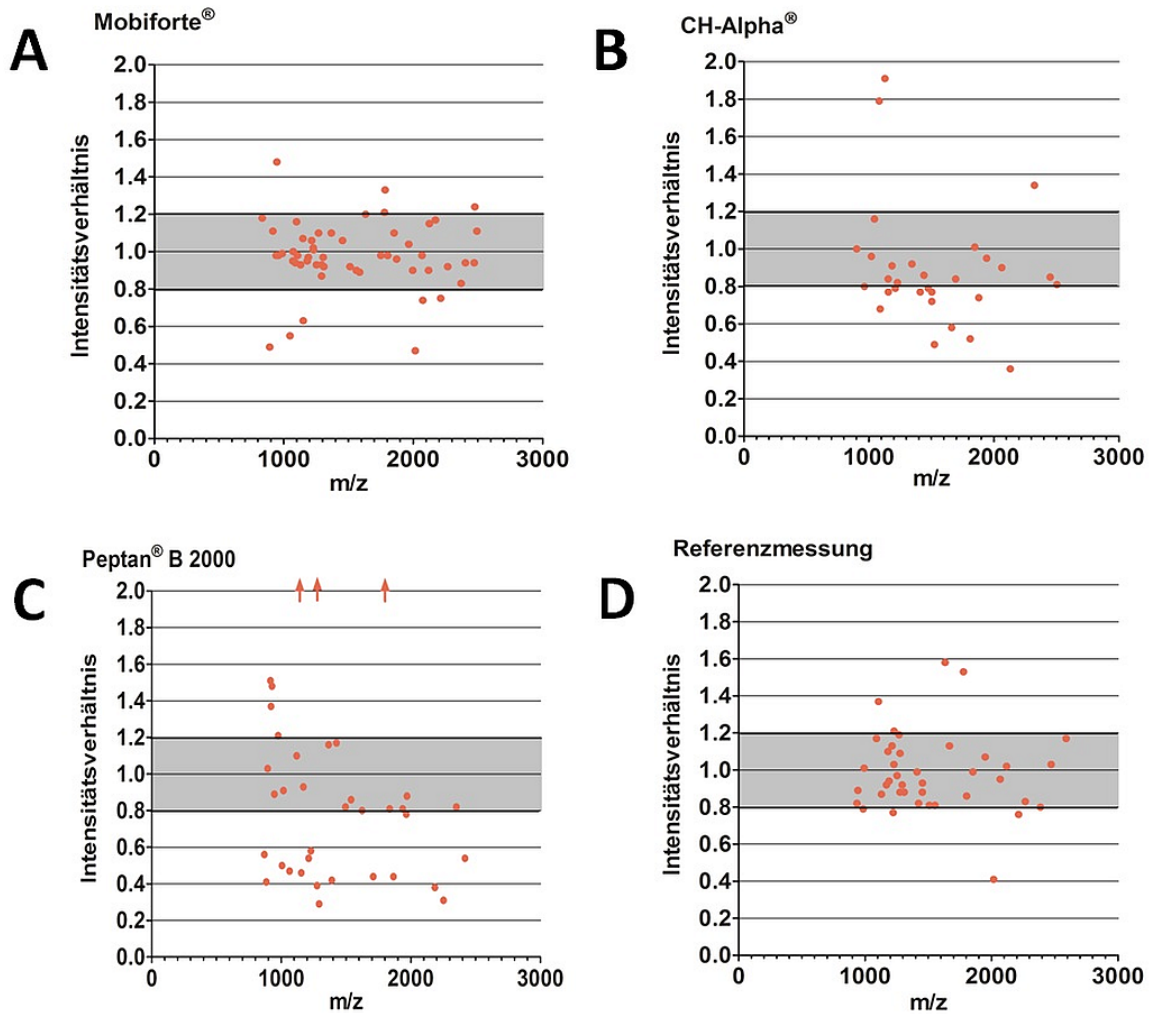
Die Auswertung der Referenzmessung (zweifache Markierung ein und derselben Mobiforte®-Charge (Lot-Nr. 11/2016/L07) mit ICPL™-0- und ICPL™-6-Reagenz) ergab 40 reproduzierbare Peakpaare, von denen 31 (= 78 %) ein Intensitätsverhältnis zwischen  $\geq 0,8$  und  $\leq 1,2$  besaßen und folglich ein anzunehmendes korrektes Peptidkonzentrationsverhältnis von 1:1 angaben (siehe auch Kapitel 11.2 Tab. 1). Das Ergebnis der Referenzmessung wurde den folgenden Chargenvergleichen zugrunde gelegt.

#### 3.2.4.2 Ergebnis Chargenvergleiche

Bei der Untersuchung der beiden CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031) und Peptan® B 2000-Chargen (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x) zeigten sich im Vergleich zur Referenzmessung signifikante Unterschiede. Der Vergleich der beiden Mobiforte®-Chargen (LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06) ergab hingegen, verglichen mit der Referenzmessung, keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 21 und Abb. 18). Eine detaillierte Auflistung aller ermittelten Intensitätsverhältnisse der verschiedenen Chargenvergleiche findet sich im tabellarischen Anhang in Kapitel 11.2. Tab. 2 - 4.

KH-Präparate (Chargenvergleich)	Anzahl Peakpaare	Anzahl Peakpaare mit Intensitätsver- hältnis $\geq 0,8$ und $\leq 1,2$	Vergleich mit Re- ferenzmessung (p-Wert)
Mobiforte®	55	43 (= 78 %)	$p \geq 0,05$
CH-Alpha®	30	14 (= 47 %)	$p = 0,012$
Peptan® B 2000	38	13 (= 34 %)	$p \leq 0,001$

**Tab. 21:** Anzahl und Verteilung der Intensitätsverhältnisse von den ermittelten Peakpaaren und Vergleich mit Referenzmessung (= 78 %)



**Abb. 18:** Die relative Häufigkeit von Peptiden in verschiedenen Chargen von (A) Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L06 und 11/2016/L07), (B) CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031), (C) Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x) und (D) der Referenzmessung (Mobiforte® LOT-Nr. 11/2016/L07 markiert mit sowohl ICPL™-0- und ICPL™-6-Isotopen). Um die Konzentrationen von Peptiden zu vergleichen, wurden die Verhältnisse der Peakintensitäten für jedes Peakpaar mithilfe der ICPL™-Methodik in den Replikaten bestimmt. Die mittleren Verhältnisse, der in jeder Charge gemessenen Peakintensitäten werden dargestellt ( $n = 2-3$ ). Peakpaare mit einem Intensitätsverhältnis von  $\geq 0,8$  und  $\leq 1,2$  wurden als gleich hoch und somit die Konzentrationen der zugrunde liegenden KH-Peptide in beiden Chargen als gleich angesehen [16]. ● = Intensitätsverhältnis, ↑ = mittleres Verhältnis des Peakpaares  $> 2$

### 3.2.5 Hauptversuch 3: Zelluläre Wirkung der KH-Präparate auf FLS

Um zu prüfen, ob verschiedene KH-Präparate bzw. Chargen eine zelluläre Wirkung auf humane kultivierte FLS entfalten, wurden FLS mit verschiedenen KH in unterschiedlichen Konzentrationen für jeweils 48 Stunden inkubiert (siehe auch 2.2.2). Anschließend wurde der Gehalt an verschiedenen Zytokinen, katabolen und anabolen Enzymen sowie Entzündungsmediatoren mithilfe von ELISAs und der Griessreaktion bestimmt. Nach Normalisierung der ermittelten Konzentrationen mit dem zellulären Proteingehalt wurde untersucht, ob ein stimulierender Effekt vorlag. In keinem Fall konnte hierbei ein stimulierender Effekt mit statistischer Signifikanz nach Zugabe von KH nachgewiesen werden. In 3.2.5.1 - 3.2.5.6 werden nachfolgend nur diejenigen Ergebnisse beschrieben und graphisch dargestellt, bei denen dennoch eine merkliche Erhöhung der Freisetzung von Interleukinen oder Zytokinen in den Nährmedien messbar war. Eine tabellarische Darstellung der zellulären Wirkung aller Präparate bzw. Chargen findet sich im tabellarischen Anhang (siehe Kapitel 11.3).

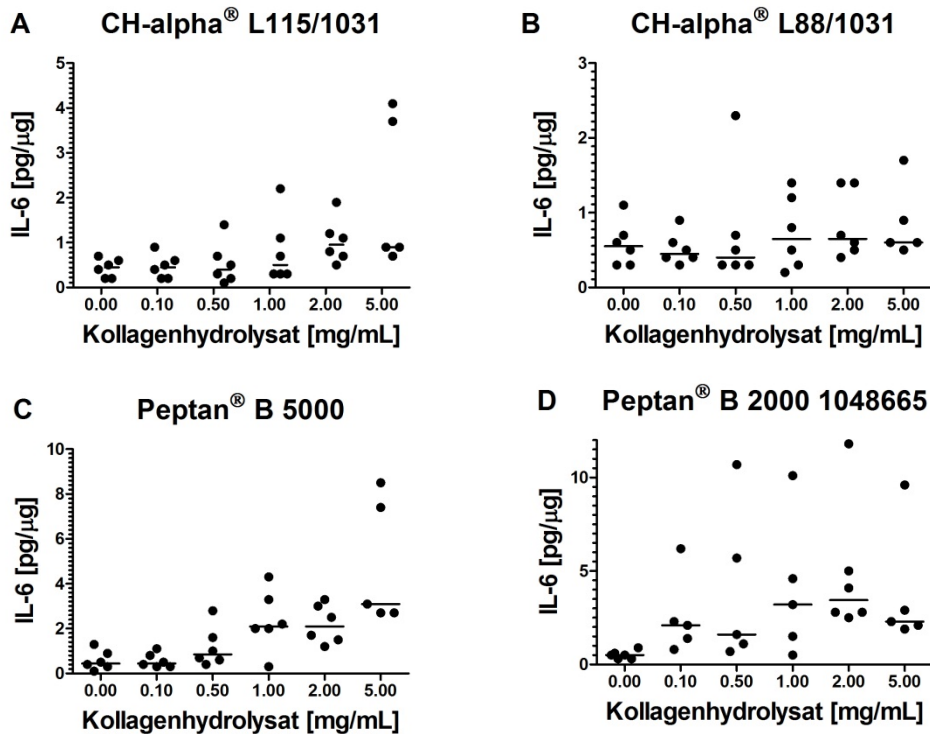
#### 3.2.5.1 Freisetzung von Interleukinen

Die Freisetzung von Interleukinen in die Nährmedien wurde mithilfe von ELISAs analysiert. Untersucht wurden die Nährmedien auf deren Gehalt an IL-1- $\beta$ , IL-6 und IL-8. Eine Tendenz zur vermehrten Freisetzung für das Zytokin IL-6 zeigte sich bei beiden untersuchten CH-Alpha<sup>®</sup>-Chargen (LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031) sowie bei Peptan<sup>®</sup> B 5000 (LOT-Nr. 1247582) und Peptan<sup>®</sup> B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665. Für das Zytokin IL-8 zeigte sich ein Trend zur vermehrten Freisetzung in die Nährmedien nach Inkubation mit Peptan<sup>®</sup> B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665 und Peptan<sup>®</sup> B 5000 LOT-Nr. 1247582. Ein statistisch signifikant stimulierender Effekt konnte bei keinem Präparat nachgewiesen werden. Bei keinem der analysierten KH-Präparate konnte IL-1 $\beta$  nach Inkubation mit KHs nachgewiesen werden.

#### Interleukin-6-Gehalt

Abbildung 19A und B zeigen einen Trend zur vermehrten Freisetzung von IL-6 in die Nährmedien bei den beiden untersuchten CH-Alpha<sup>®</sup>-Chargen (LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031). In Abb. 19C und D wird die Freisetzung von IL-6 nach Zugabe von Peptan<sup>®</sup>

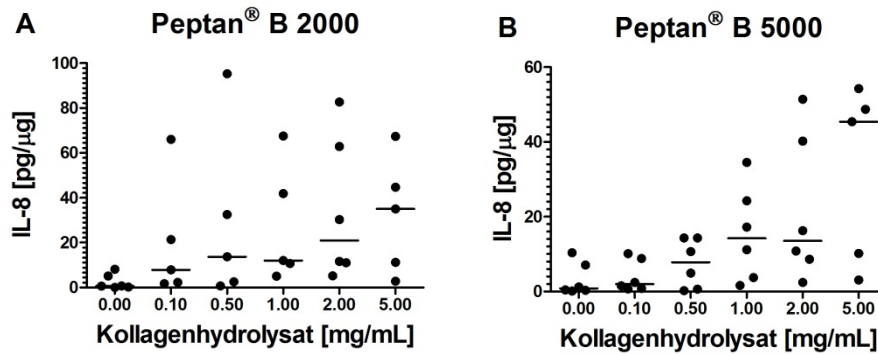
B 5000 und Peptan® B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665 dargestellt. Ein statistisch signifikant stimulierender Effekt konnte bei keinem der KH-Präparate nachgewiesen werden. Eine tabellarische Darstellung der Messergebnisse findet sich im tabellarischen Anhang (siehe Kapitel 11.3.1, Tab. 1, 4 und 5).



**Abb. 19:** Die konzentrationsabhängige Wirkung von zwei CH-Alpha®-Chargen (= **A** und **B**), Peptan® B 5000 (= **C**) und einer Peptan® B 2000-Charge (= **D**) auf die Freisetzung von IL-6. Gezeigt wird jeweils der Gehalt von IL-6 in [pg] pro [μg] zellulärem Protein in den Nährmedien von FLS nach 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen KH-Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt sind die Einzelwerte und Mediane.

### Interleukin-8-Gehalt

Einen Trend zur vermehrten Freisetzung von IL-8 in die Nährmedien zeigte sich bei den KH-Präparaten Peptan® B 2000 LOT-Nr. 1048665 und Peptan® B 5000 LOT-Nr. 1247582, siehe Abb. 20. In keinem Fall wurde ein statistisch signifikanter stimulierender Effekt nachgewiesen. Eine tabellarische Darstellung der Messergebnisse findet sich im tabellarischen Anhang (siehe Kapitel 11.3.2, Tab. 1 und 3).



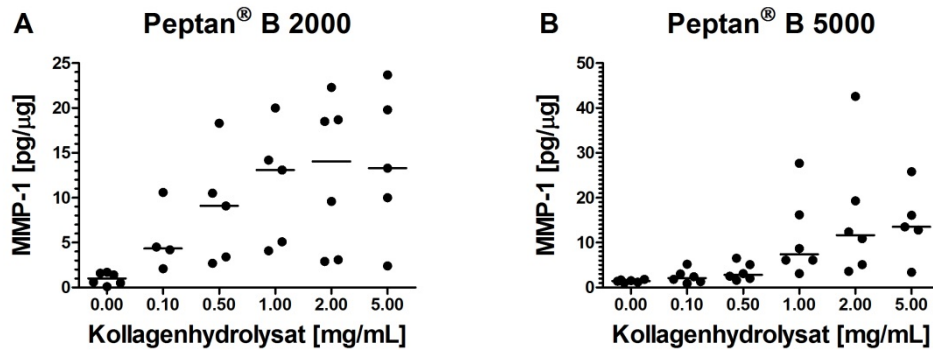
**Abb. 20:** Die konzentrationsabhängige Wirkung von Peptan® B 2000 (= **A**) und Peptan® B 5000 (= **B**) auf die Freisetzung von IL-8. Gezeigt wird jeweils der Gehalt von IL-8 in [pg] pro [μg] zellulärem Protein in den Nährmedien von FLS nach 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen KH-Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt sind die Einzelwerte und Mediane.

### 3.2.5.2 Gehalt von Matrix-Metalloproteinasen im Nährmedium

Die Freisetzung von MMPs in die Nährmedien wurde mithilfe von ELISAs bestimmt. Untersucht wurden die Nährmedien auf deren Gehalt an MMP-1, -3, -13 und Pro-MMP-13. Eine Tendenz zu einer konzentrationsabhängig erhöhten Freisetzung zeigte sich bei MMP-1 und MMP-3 lediglich bei dem Präparat Peptan® B 5000 und der Peptan® B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665. In keinem Fall wurde ein statistisch signifikanter stimulierender Effekt nachgewiesen. Weder MMP-13 noch Pro-MMP-13 konnten in den analysierten Nährmedien nachgewiesen werden.

#### Matrix-Metalloproteinase-1

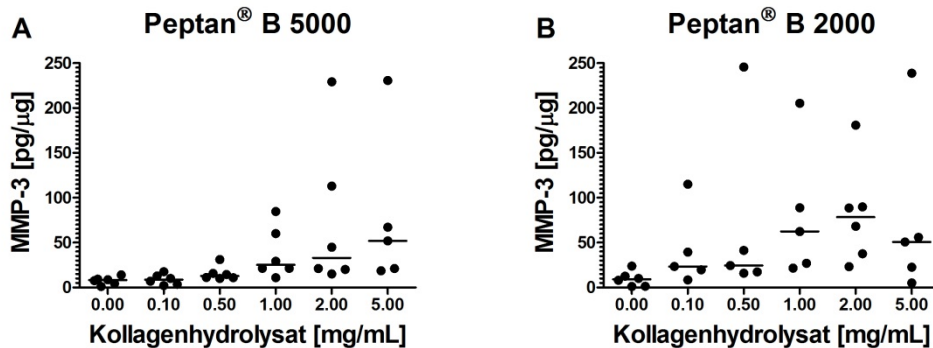
Abb. 21 zeigte eine vermehrte Freisetzung von MMP-1 in die Nährmedien bei Peptan® B 5000 LOT-Nr. 1247582 und Peptan® B 2000 LOT-Nr. 1048665. Ein statistisch signifikant stimulierender Effekt konnte bei keinem Präparat nachgewiesen werden. Eine tabellarische Darstellung der Messergebnisse findet sich im tabellarischen Anhang (siehe Kapitel 11.3.3, Tab. 1 und 3).



**Abb. 21:** Die konzentrationsabhängige Wirkung von Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1048665 (= A) und Peptan® B 5000, LOT-Nr. 1247582 (= B) auf die Freisetzung von MMP-1. Gezeigt wird jeweils der Gehalt von MMP-1 in [pg] pro [μg] zellulärem Protein in den Nährmedien von FLS nach 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen KH-Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt sind die Einzelwerte und Mediane.

### Matrix-Metalloproteinase-3

Eine vermehrte, jedoch statistisch nicht signifikante, Freisetzung von MMP-3 in die Nährmedien konnte nur bei Peptan® B 5000 LOT-Nr. 1247582 und Peptan® B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665 beobachtet werden. Diese werden in Abb. 22 dargestellt. Eine tabellarische Darstellung der Messergebnisse findet sich in Kapitel 11.3.4, Tab. 1.



**Abb. 22:** Die konzentrationsabhängige Wirkung von Peptan® B 5000 LOT-Nr. 1247582 (= A) und Peptan® B 2000 LOT-Nr. 1048665 (= B) auf MMP-3. Gezeigt wird jeweils der Gehalt von MMP-3 in [pg] pro [μg] zellulärem Protein in den Nährmedien von FLS nach 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen KH-Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt sind die Einzelwerte und Mediane.

### **3.2.5.3 Freisetzung von Tumornekrosefaktor-α im Nährmedium**

Mit keinem der verwendeten TNF-α-Immunoassays („Human TNF-α“ und „Human TNF-α Ultra Sensitive“) konnte nach 48-stündiger Inkubation der FLS mit den verschiedenen KH-Präparaten TNF-α in den Nährmedien nachgewiesen werden.

### 3.2.5.4 Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub>

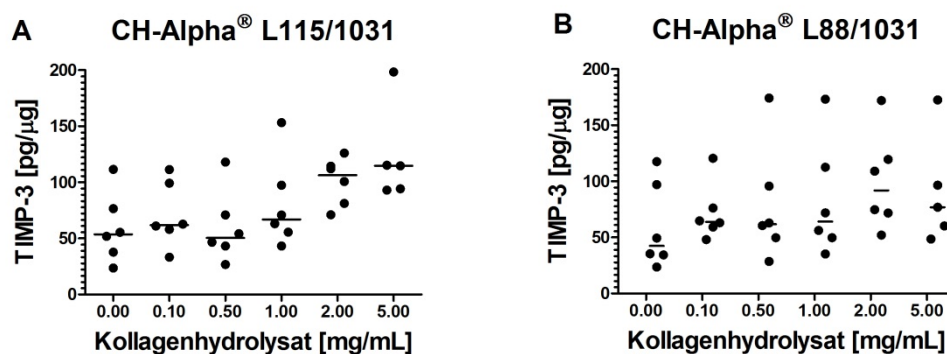
Es konnte kein PGE<sub>2</sub> in den untersuchten Nährmedien nach 48-stündiger Inkubation der FLS mit den verschiedenen KH-Präparaten nachgewiesen werden.

### 3.2.5.5 Freisetzung von Stickstoffmonoxid

Auch NO konnte in keinem der untersuchten Nährmedien nach 48-stündiger Inkubation der FLS mit den verschiedenen KH-Präparaten nachgewiesen werden.

### 3.2.5.6 Gehalt von TIMP-3 im Nährmedium

Die Freisetzung von TIMP-3 in die Nährmedien wurde mithilfe von ELISAs bestimmt. Eine vermehrte Freisetzung von TIMP-3 zeigte sich lediglich bei den CH-Alpha®-Chargen LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031 (siehe Abb. 23). In keinem Fall wurde in signifikanter, stimulierender Effekt beobachtet. Eine tabellarische Darstellung der Messergebnisse findet sich im tabellarischen Anhang (siehe Kapitel 11.3.5, Tab. 4 und 5).



**Abb. 23:** Die konzentrationsabhängige Wirkung der beiden CH-Alpha®-Chargen LOT-Nr. L115/1031 (= A) und LOT-Nr. L88/1031 (= B) auf die Freisetzung von TIMP-3. Gezeigt wird jeweils der Gehalt von TIMP-3 in [pg] pro [μg] zellulärem Protein in den Nährmedien von FLS nach 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen KH-Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt sind die Einzelwerte und Mediane.

### 3.2.5.7 Vergleich der zellulären Wirkung verschiedener KH auf FLS

Neben der Untersuchung auf eine konzentrationsabhängige Wirkung der verschiedenen KH-Präparate sollte ferner überprüft werden, ob sich verschiedene Chargen eines KH-

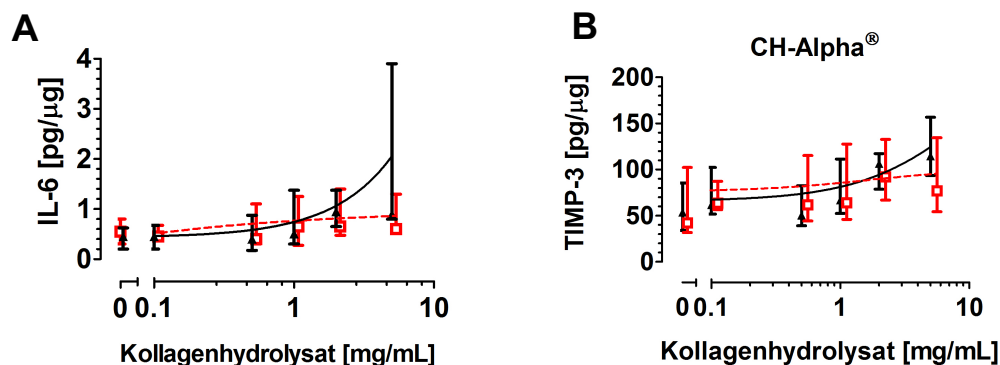


Präparates in ihrer zellulären Wirkung unterscheiden. Hierfür wurden die konzentrationsabhängige Wirkung der verschiedenen Chargen bzw. der verschiedenen KH-Präparate bei KH-Konzentrationen, die wahrscheinlich auch *in vivo* erreicht werden [89, 90], miteinander verglichen.

### CH-Alpha®-Chargenvergleiche

#### IL-6 und TIMP-3-Gehalt

Wie in Abbildung 24 dargestellt, zeigten beide untersuchten CH-Alpha®-Chargen eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der IL-6 und TIMP-3 Konzentrationen in den Nährmedien, die sich bei Konzentrationen von 1 mg/ml KH kaum unterschieden. Eine tabellarische Darstellung der Messergebnisse findet sich im tabellarischen Anhang (siehe Kapitel 11.3.5, Tab. 4 und 5).



**Abb. 24:** Die konzentrationsabhängige Wirkung der zwei CH-Alpha®-Chargen LOT-Nr. L115/1031 (=▲) und L88/1031 (=□) auf die Freisetzung von (A) IL-6 und (B) TIMP-3, ausgedrückt in [pg] pro [µg] zellulärem Protein, in die Nährmedien von kultivierten humanen FLS nach 48-stündiger Inkubation. Dargestellt sind jeweils die Mediane und IQR (n = 5-6) mithilfe einer 3- (= B) bzw. 4-Parameteranalyse (= A).

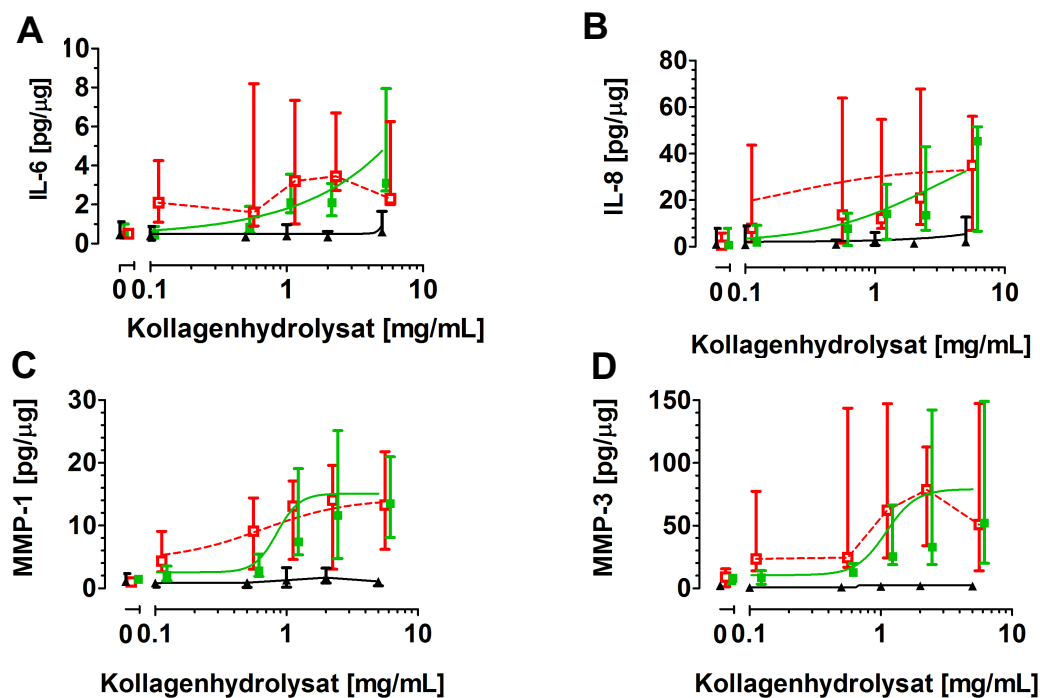
### Vergleich von Peptan® B 5000 und zwei Peptan® B 2000-Chargen

Neben den Chargenvergleichen eines KH-Präparates sollte ebenfalls untersucht werden, ob sich verschiedene KH-Präparate eines Herstellers in ihrer zellulären Wirkung auf kultivierte FLS unterscheiden. Exemplarisch wurden dazu das KH-Präparat Peptan® B 5000 mit den beiden Peptan® B 2000-Chargen (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x) des Herstellers Rousselot verglichen. Hierbei ähnelten sich Peptan® B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665 und das Präparat Peptan B 5000 LOT Nr. 1247582 tendenzi-

ell in ihrer Wirkung auf die Freisetzung von IL-6, IL-8 sowie von MMP-1 und MMP-3, wohingegen sich beide Präparate tendenziell von der Peptan® B 2000-Charge LOT-Nr. 1266793/x unterscheiden.

#### IL-6, IL-8, MMP-1 und MMP-3 Gehalt in den Nährmedien

Weder bei Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) noch bei den beiden untersuchten Peptan® B 2000-Chargen (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x) konnte eine statistisch signifikant erhöhte Freisetzung von IL-6, IL-8, MMP-1 oder MMP-3 in die Nährmedien nachgewiesen werden. Die Abbildungen 26A-D geben jedoch dennoch Hinweise auf eine mögliche unterschiedliche Wirkung der Präparate und Chargen. So zeigten sich bei den KH-Präparaten Peptan® B 5000 und Peptan® B 2000 LOT-Nr. 1048665 nach Zugabe von 1 mg/ml KH eine Tendenz zu einer vermehrten Freisetzung von IL-6, IL-8, MMP-1 und MMP-3 in die Nährmedien, jedoch nicht bei Peptan® B 2000-Charge LOT-Nr. 1266793/x. Eine tabellarische Darstellung der Messergebnisse findet sich im tabellarischen Anhang (siehe Kapitel 11.3.1, Tab. 1 - 3).



**Abb. 25:** Die konzentrationsabhängige Wirkung von zwei Peptan® B 2000-Chargen LOT-Nr. 1266793/x (=▲) und 1048665 (=□) sowie Peptan® B 5000 LOT-Nr. 1247582 (=■) auf die Freisetzung von (A) IL-6, (B) IL-8, (C) MMP-1 und (D) MMP-3, ausgedrückt in [pg] pro [μg] zellulärem Protein, in die Nährmedien von kultivierten humanen FLS nach 48-stündiger Inkubation. Dargestellt sind jeweils die Mediane und IQR (n = 3-6) mithilfe einer 4-Parameteranalyse.

## 4 Diskussion

Während der arthrose-induzierten Entzündung spielen Synoviozyten sowohl in der strukturellen Schädigung der Gelenke als auch in der klinischen Symptomatik eine entscheidende Rolle, indem sie unter anderem Entzündungsmediatoren und katabole Enzyme synthetisieren [2, 12, 57, 58, 88, 118]. Therapeutische Mittel, die den Krankheitsverlauf der OA beeinflussen, sind Gegenstand aktueller Forschung [34, 64]. Unter Patienten mit OA erfreuen sich alternative oder additive medizinische Therapieoptionen, zu denen auch Nahrungsergänzungsmittel wie die Kollagenhydrolysate gezählt werden, immer größerer Beliebtheit.

KH bestehen vorwiegend aus hydrolysiertem Kollagen Typ I, das aus verschiedenen Wirbeltierarten nach bislang unveröffentlichten firmeninternen Herstellungsverfahren gewonnen wird. Die genaue Zusammensetzung und Konzentration der enthaltenen Peptide in KH-Präparaten ist unbekannt und unterscheidet sich bei verschiedenen KH-Präparaten deutlich voneinander [89, 90, 105]. Die klinische Wirksamkeit von KH bei osteoarthritischen Gelenkerkrankungen bleibt bislang unklar: Während einige Studien KH eine schmerzreduzierende Wirkung attestieren [4, 17], konnte diese Beobachtung in anderen Studien nicht oder nur teilweise bestätigt werden [60, 67].

Mögliche klinische Effekte, die durch KH hervorgerufen werden, wurden bislang vor allem der Wirkung von KH auf das Knorpelgewebe zugeschrieben. Daher erfolgten in der Vergangenheit einige Untersuchungen an kultivierten tierischen oder humanen Chondrozyten sowie Knorpelimplantaten, um die Wirkungseffekte von KH und endogenen Kollagenfragmenten näher zu analysieren. Jedoch zeigten sich auch in diesen Studien unterschiedliche und zum Teil konträre Resultate [23, 40, 70, 73, 89, 90].

Da die OA als Gelenkerkrankung nicht nur den Knorpel, sondern das gesamte Gelenk betrifft, muss eine mögliche klinische Wirkung von KH jedoch nicht zwangsläufig durch Chondrozyten vermittelt werden, sondern sie könnte auch durch Beeinflussung weiterer Gelenkstrukturen, beispielsweise der Synovialmembran, hervorgerufen werden [90]. Über die Ursachen der synovialen Entzündungsreaktion ist aktuell nur wenig bekannt [52, 58]. Im Zellkulturversuch an bovinen, juvenilen FLS konnte die alleinige Exposition von kleinen Knorpelpartikeln eine Synovitis auslösen [98], jedoch bleibt unklar, welche Rolle in diesem Fall endogene Kollagenfragmente spielen. Ohara et al. [74] berichteten, dass Pro-Hyp-Peptide die Hyaluronsäuresynthese von aus Kaninchen

stammenden FLS stimulierten. Unseres Wissens ist jedoch keine Studie bekannt, die die Wirkung von exogen zugeführten KH auf Synoviozyten systematisch untersuchte.

In einer anderen Studie aus dem Jahr 2007 veröffentlichten Ohara et al. [75] Daten, wonach sich die Zusammensetzung und der Gehalt von hydroxyprolinhaltigen Peptiden im Serum nach Ingestion verschiedener KH-Präparate unterschied. Ohara et al. folgerten darauf hin, dass eine mögliche, durch hydroxyprolinhaltige Peptide vermittelte Wirkung der KH von der verwendeten Spezies oder Kollagentyp abhängig sein könnte [75]. In einer weiteren Studie zeigten Ohara et al. [74] im Tiermodell, dass sich die Pro-Hyp-Serum- und epiphysären Proteoglykangehalte nach Gabe verschiedener KH-Präparate unterschieden. Schadow et al. [89] berichteten 2013 schließlich erstmals davon, dass sich die Wirkung verschiedener KH-Präparate auf Chondrozyten *in vitro* deutlich unterscheidet und setzten dies in Zusammenhang mit den ebenfalls festgestellten Unterschieden in der biochemischen Zusammensetzung der KH-Präparate [89, 90].

Da KH aus Naturprodukten hergestellt werden und überdies die genauen Herstellungsverfahren der verschiedenen KH-Präparate unbekannt sind, stellt sich ausgehend von diesen Ergebnissen die Frage, ob verschiedene Herstellungschargen ein und desselben KH-Präparates über die gleiche biochemische Zusammensetzung an Peptiden verfügen und ob sich dies in ihrer zellulären Wirkung widerspiegelt. Um diese Fragen zu beantworten, verglichen wir zehn verschiedene KH-Präparate bzw. deren Chargen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bezüglich ihrer peptidischen Zusammensetzung und untersuchten weiter die zelluläre Wirkung von sieben der zehn massenspektrometrisch analysierten Präparate/Chargen auf humane FLS.

## 4.1 Methodik

### 4.1.1 Massenspektrometrische Analysen

Um die Peptidzusammensetzung verschiedenener KH-Präparate und deren Chargen miteinander zu vergleichen, bedienten wir uns in Hauptversuch 1 und 2 der MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Als Peptide wurden hierbei diejenigen Peaks in den Massenspektren gewertet, die reproduzierbar in allen drei angefertigten Replikaten eines KH-Präparates gemeinsam auftraten, siehe auch Kapitel 2.2.5.2 und 2.2.6.1.

In Hauptversuch 1 wurden die Anzahl an unterschiedlichen reproduzierbaren Peaks bei verschiedenen KH-Präparaten und deren Chargen ermittelt und anschließend miteinander verglichen. Außerdem ermittelten wir den prozentualen Anteil an gemeinsam enthaltenen Peaks und verglichen diesen mit unseren Referenzwerten. In Hauptversuch 2 wurde mithilfe von ICPL<sup>TM</sup>-Markierung untersucht, ob in verschiedenen Chargen eines KH-Präparates gemeinsam vorhandene KH-Peptide in ähnlich hohen Konzentrationen vorliegen.

Die Peptide der KH-Proben wurden für die massenspektrometrischen Analysen sorgfältig aufbereitet und von Zusatzstoffen gereinigt. Da KH-Präparate sehr komplexe Peptidgemische darstellen, teilten wir die Proben mittels RP-HPLC in mehrere Fraktionen auf, um auf diese Weise Überlagerungen im Massenspektrogramm zu vermeiden. Die Akquisition der Massenspektren erfolgte manuell im Reflektor-Modus. Da es aktuell nicht möglich ist, mit denselben Messeinstellungen größere Massenbereiche mit einer ausreichend hohen Sensitivität und Auflösung in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie zu erfassen, wurde von uns ein exemplarischer Messbereich von 500 bis 4000 m/z ausgewählt, dessen Messoptimum im Bereich von 800 bis 2500 m/z lag. Somit wurden Peptide mit höheren Massenzahlen von unseren Messungen nicht erfasst. Der untersuchte Messbereich genügt unserer Meinung jedoch, um die hier allgemein gehaltenen Aussagen über die Peptidzusammensetzung verschiedener KH und deren Chargen treffen zu können.

Die Unterscheidung von verschiedenen Peptiden erfolgte anhand ihrer jeweiligen Fraktionsnummer und ihrer spezifischen Massenzahl, siehe Kapitel 2.2.5.3 und 2.2.6.1. Zur Unterscheidung waren die Peptide zunächst mittels RP-HPLC in verschiedene Fraktionen nach ihren polaren Eigenschaften aufgetrennt und anschließend ihre jeweilige Massenzahl mithilfe von MALDI-TOF-MS ermittelt worden, siehe auch Kapitel 2.2.1.3 - 4. Eine Differenzierung zwischen verschiedenen isobaren Peptiden mit gleicher Massenzahl, die zusätzlich ähnliche polare Eigenschaften besitzen, war daher nicht gewährleistet. Da dies in der Realität jedoch nur selten vorkommen dürfte, wurden solche Ausnahmefälle von uns nicht weiter berücksichtigt.

Beim Zusammenführen von zwei ICPL<sup>TM</sup>-markierten Proben kann es zu minimalen mengenmäßigen Unterschieden kommen, die das Ergebnis des Konzentrationsvergleichs verfälschen könnten. Um dies zu vermeiden, ermittelten wir für jede Messung einen Korrekturfaktor. Dieser errechnete sich durch Bildung des arithmetischen Mittels

aller ermittelten Intensitätsverhältnisse (Peakintensität-ICPL™<sub>6</sub>-Reagenz/ Peakintensität-ICPL™<sub>0</sub>-Reagenz) und wurde mit den Intensitäten der Peaks, die mit der ICPL™<sub>0</sub>-Reagenz markiert worden waren, multipliziert, siehe auch Kapitel 2.2.6.1. Der errechnete Korrekturfaktor lag bei unseren Untersuchungen durchschnittlich bei 1,11.

Um Peaks in den Massenspektren möglichst sicher als Peptide zu identifizieren, kombinierten wir verschiedene Auswahlkriterien miteinander: So fertigten wir von allen KH-Proben jeweils drei Replikate an und verwendeten im Folgenden nur diejenigen Peaks, die in allen Replikaten gemeinsam vorkamen (= reproduzierbare Peaks). Da sich in unseren Vorversuchen kein optimales S/N-Verhältnis ermitteln ließ, jedoch der prozentuale Anteil an reproduzierbaren Peaks bei einem  $S/N \geq 10$  im Vergleich zu einem  $S/N \geq 3$  in keinem der von uns untersuchten Fälle absank, verwendeten wir im Hauptversuch 1 ein S/N von  $\geq 10$ , um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Durchschnittlich enthielten unsere Messungen bei der Wahl eines S/N von  $\geq 10$  noch etwa 36 % der Peaks, die bei einem S/N von  $\geq 3$  detektiert wurden. Neben Hintergrundrauschen, Matrixpolymeren und weiteren Artefakten finden sich bei den herausgefilterten Peaks möglicherweise auch Peptide, die nur in sehr geringen Mengen vorhanden waren oder in den Messungen nicht ausreichend erfasst wurden. Bei den mit ICPL™ markierten Proben in Hauptversuch 2 wählten wir hingegen ein S/N von  $\geq 3$ , da durch die ICPL™-Markierung eine zusätzliche Möglichkeit der Peptididentifikation gegeben war.

Die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen stellt in der Massenspektrometrie nach wie vor eine große Herausforderung dar. Um die Reproduzierbarkeit unserer Messergebnisse und damit die Vergleichbarkeit unserer massenspektrometrischen Analysen zu gewährleisten, überprüften wir daher anhand der nichtmarkierten Proben, ob bei den Analysen verschiedener KH-Präparate und -Chargen der prozentuale Anteil an reproduzierbaren Peaks gleich blieb. Dieser lag im Durchschnitt bei 60 %. Bei keinem der untersuchten Präparate oder Chargen zeigten sich hiervon signifikante Abweichungen, sodass wir im weiteren Verlauf von der prinzipiellen Vergleichbarkeit der verschiedenen Präparate und Chargen ausgingen.

Außerdem ermittelten wir für Hauptversuch 1 und 2 verschiedene Referenzwerte mit denen wir die Ergebnisse unserer Präparat- und Chargenvergleiche abglichen. In Haupt-

versuch 1 untersuchten wir hierfür die Herstellungsladung eines KH-Präparates (CH-Alpha® LOT-Nr. L170/1031) an zwei bzw. drei verschiedenen Tagen massenspektrometrisch und ermittelten den Anteil an gemeinsam auftretenden Peaks. Der Anteil an gemeinsamen Peaks, der an zwei unterschiedlichen Tagen ermittelt wurde, wurde den Vergleichen von zwei Präparaten/Ladungen zugrunde gelegt und der an drei unterschiedlichen Tagen ermittelte Anteil den Vergleichen von drei Präparaten/Ladungen, siehe auch Kapitel 2.2.5.4.

Der Referenzwert in Hauptversuch 2 wurde bestimmt, indem wir eine Herstellungsladung von Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) sowohl mit der leichten als auch mit der schweren ICPL™-Reagenz markierten. Nachfolgend wurde die Anzahl an Peakpaaren, deren Intensitätsverhältnis zwischen  $\geq 0,8$  und  $\leq 1,2$  lag, ermittelt und den Ladungsvergleichen zugrunde gelegt, siehe auch Kapitel 2.2.6.3.

Bei den Referenzmessungen in Hauptversuch 1 zeigte sich, dass selbst wenn dieselbe Herstellungsladung an verschiedenen Tagen untersucht wurde, nur 51 % der reproduzierbaren Peaks bei zwei unterschiedlichen Tagen und 42 % der reproduzierbaren Peaks bei drei unterschiedlichen Tagen gemeinsam in allen Referenzmessungen auftraten. Bei den mit ICPL™-markierten Proben in Hauptversuch 2 konnten in unserem Referenzvergleich nur 78 % aller ermittelten Peptidkonzentrationen als identisch identifiziert werden. Die Ergebnisse der Referenzmessungen lagen damit deutlich unter den theoretisch jeweils erreichbaren 100 % und spiegelten damit die prinzipiell schlechte Reproduzierbarkeit massenspektrometrischer Analysen wieder.

Im Hauptversuch 2 fanden sich beim Vergleich der KH-Ladungen (Mobiforte®, Ladungen LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06, Peptan® B 2000, Ladungen LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x sowie CH-Alpha®, Ladungen LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031) in allen drei Vergleichen nur halb so viele gemeinsame Peptide wie bei denselben Ladungsvergleichen in Hauptversuch 1. Grund dafür ist möglicherweise, dass wir, um Überlagerungen und falsch-positive Messergebnisse in den Massenspektren zu vermeiden, ausschließlich Peptidpaare, die einen Massenunterschied von 6,0204 oder 12,0408 Da besaßen, in unsere Analysen miteinbezogen, obwohl theoretisch auch Pärchen mit größeren Massenunterschieden möglich waren. Ferner wurden unter Umständen vielleicht nicht alle, sondern nur diejenigen Peptide, die in ausreichend hoher Konzentration in den KH-Proben vorkamen, genügend mit den ICPL™-Reagenzien markiert.

#### 4.1.2 Zellkulturversuch an synovialen Fibroblasten

In unseren *in vitro*-Untersuchungen wurden FLS, die aus humanen arthrotischen Kniegelenken stammten, verwendet. In Anlehnung an Neumann et al. [69], verwendeten wir für unsere Untersuchungen ausschließlich frische FLS, die aus der zweiten bis vierten Zellpassage stammten, um durch Zellkultur bedingte artifizielle Effekte zu vermeiden. Die verabreichten KH-Proben bzw. die darin enthaltenen Peptide waren, im Gegensatz zu Hauptversuch 1 und 2, nicht weiter aufgereinigt worden, sondern wurden lediglich in entsprechend aufbereitetem Nährmedium gelöst und verdünnt. Insbesondere die Präparate von Mobiforte® und CH-Alpha® enthielten Zusatzstoffe wie beispielsweise Vitamin C und Fruktose, siehe auch Kapitel 2.1.8. Somit ist nicht auszuschließen, dass zelluläre Effekte auch durch die enthaltenen Zusatzstoffe hervorgerufen wurden. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob die verschiedenen KH-Präparate einen Effekt auf die kultivierten FLS ausgeübt hatten. Dies überprüften wir, indem wir den Gehalt an verschiedenen entzündungsfördernden Zyto- und Chemokinen sowie Entzündungsmediatoren in den Nährmedien analysierten. Außerdem untersuchten wir, ob sich Hinweise für die vermehrte Freisetzung von Matrix-degradierenden Enzymen wie MMPs in den Nährmedien der mit KH inkubierten FLS finden ließen. Schließlich untersuchten wir auch den Effekt der KH-Präparate auf die Freisetzung von dem protektiv wirkenden Metalloproteinaseinhibitor TIMP-3.

Für die Bestimmung des Gehalts von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 in den Nährmedien wurden ELISAs eingesetzt. Um auch sehr geringe Mengen der beiden im osteoarthritischen Geschehen zentralen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  [108] detektieren zu können, verwendeten wir bei diesen mehrere Enzym-Immunoassays mit unterschiedlicher Sensitivität und konzentrierten die Nährmedien mithilfe eines Zentrifugalfilters zusätzlich auf.

PGE<sub>2</sub> wird *in vivo* rasch zu inaktiven Derivaten metabolisiert. Um dennoch den Gehalt an freigesetztem PGE<sub>2</sub> in den Nährmedien ermitteln zu können, verwendeten wir einen kompetitiven Immunoassay, der sowohl PGE<sub>2</sub> als auch dessen inaktive Derivate detektierte. Auch NO besitzt *in vivo* nur eine sehr kurze Halbwertszeit. Ein Teil von NO oxidiert rasch zu Nitrit oder Nitrat [111]. Der NO-Gehalt wurde von uns daher indirekt mittels Griess-Reaktion [30, 111] nach zusätzlicher Reduktion von Nitrat mittels Nitrat-reduktase durch die Bestimmung des Nitritgehalts ermittelt.



Mögliche Knorpelmatrix-degradierende Effekte der KH untersuchten wir mit der Bestimmung der MMP-Gehalte in den Nährmedien. Mithilfe von Enzym-Immunoassays ermittelten wir die Konzentrationen von (Pro-)MMP-1, -3 und -13. Die Enzym-Immunoassays von MMP-1 und -3 konnten nicht zwischen aktiven oder inaktiven Formen der MMPs unterscheiden, daher muss ein erhöhter Gehalt der MMPs in den Nährmedien jedoch nicht zwangsläufig mit einer vermehrten Aktivität von MMPs einhergehen. Den Einfluss von KH auf die Freisetzung von TIMP-3 wurde ebenfalls mit einem Enzym-Immunoassay ermittelt. Ein Vorversuch, in dem wir anhand des TIMP-3-Assays überprüften, ob sich markante Unterschiede in den ermittelten Standardkurven ergeben, wenn die Standards einmal in dem mitgelieferten „Reagent Diluent“ und einmal in den Nährmedien der zu untersuchenden Proben angesetzt werden, zeigte in beiden Medien nahezu identische Ergebnisse. Wir verwendeten deswegen in allen weiteren Untersuchungen den mitgelieferten „Reagent Diluent“.

## 4.2 Biochemische Zusammensetzung der Kollagenhydrolysate

Wir untersuchten zehn verschiedene KH-Präparate bzw. deren Chargen. Dazu gehörten die beiden von Rousselot stammenden bovinen Präparate Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) sowie zwei Chargen von Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x). Die beiden Präparate unterscheiden sich laut Herstellerangaben in ihrem mittleren Molekulargewicht (5000 und 2000 Da). Außerdem untersuchten wir zwei fischhaltige KH-Präparate von Rousselot, Peptan® F 5000 (LOT-Nr. 101372) und Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 1010903), die sich ebenfalls laut Herstellerangabe in ihrem mittleren Molekulargewicht (5000 und 2000 Da) unterscheiden. Auch aus bovinem Kollagen hergestellt, jedoch ohne Angabe des mittleren Molekulargewichts, waren die drei von Gelita stammenden CH-Alpha®-Chargen (LOT-Nr. L115/1031, L88/1031 und L170/1031). Schließlich untersuchten wir außerdem zwei Chargen des porkinen KH-Präparates Mobiforte®, dessen Hersteller Twardy ebenfalls keine weiteren Angaben zum mittleren enthaltenen Molekulargewicht machte.

**KH-Präparate unterscheiden sich in ihrer Anzahl an enthaltenen KH-Peptiden.**  
Die Menge an ermittelten reproduzierbaren Peaks und somit auch die Anzahl an enthal-

tenen Peptiden in den verschiedenen KH-Präparaten unterschieden sich in dem von uns analysierten Messbereich in den meisten Fällen deutlich voneinander. Die geringste Anzahl an Peptiden konnten bei Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) mit 68 reproduzierbaren Peaks und Peptan® F 5000 (LOT-Nr. 101372) mit 72 reproduzierbaren Peaks ermittelt werden. Die höchste Anzahl an Peaks fand sich bei dem Präparat Peptan® B 2000 (Lot-Nr. 1266793/x) mit 196 reproduzierbaren Peaks. Die Tatsache, dass die beiden Präparate Peptan® B und - F 5000 die geringste Anzahl an reproduzierbaren Peaks aufwiesen, beruht vermutlich darauf, dass das angegebene mittlere Molekulargewicht der beiden Präparate von 5000 Da nicht mehr in unserem Messbereich lag und daher wahrscheinlich ein Großteil der enthaltenen Peptide in den Massenspektren nicht erfasst wurde. Dennoch zeigten sich auch bei den untersuchten KH-Präparaten mit einem angegebenen, niedrigeren mittleren Molekulargewicht deutliche Unterschiede in der Peakanzahl: So konnten beispielsweise bei Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1266793/x) 196 reproduzierbare Peaks ermittelt werden und bei Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 1010903) lediglich 72.

**KH-Präparate, die aus der gleichen Tierspezies hergestellt wurden, enthalten nicht zwangsläufig eine ähnlich hohe Anzahl an Peptiden.** Wir konnten in unseren Untersuchungen keine Tendenz dahingehend feststellen, dass unterschiedliche KH-Präparate, die aus derselben Tierspezies hergestellt wurden, in dem von uns analysierten Messbereich eine ähnlich hohe Anzahl an Peptiden besaßen. So fanden sich in beispielsweise in den bovinen Peptan® B 2000-Präparaten im Schnitt die häufigste Anzahl an enthaltenen Peptiden, wohingegen die ebenfalls bovinen CH-Alpha®-Chargen mit ihrer Peptidanzahl lediglich im Mittelfeld der von uns angestellten Präparatanalysen rangierten. Die Anzahl an enthaltenen Peptiden unterschied sich in dem von uns analysierten Messbereich bei Peptan® B2000- und CH-Alpha®-Präparaten statistisch signifikant voneinander. Das ebenfalls bovine Präparat Peptan® B 5000 enthielt von allen untersuchten Präparaten den geringsten Anteil an Peptiden, wenngleich dies auch auf den von uns analysierten Messbereich zurückzuführen sein könnte. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Herstellungsmethoden vermutlich einen größeren Einfluss auf die Anzahl und das durchschnittliche Massengewicht der enthaltenen Peptide haben als die verwendete Tierspezies.

**KH-Präparate unterscheiden sich in ihrer spezifischen Peptidzusammensetzung deutlich voneinander, unabhängig davon, ob sie aus derselben Tierspezies hergestellt wurden oder von demselben Hersteller stammen.** Die Überprüfung auf gemeinsam enthaltene Peptide in den KH-Präparaten Peptan® F 2000 und –F 5000, Peptan® B 2000 und – B 5000 sowie Mobiforte® und CH-Alpha® zeigte, dass klare Unterschiede zwischen den verschiedenen Präparaten bestehen. In allen von uns angestellten KH-Präparat-Vergleichen unterschieden sich die untersuchten KH-Präparate statistisch signifikant voneinander im Vergleich zu unserer Referenzmessung. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob die untersuchten Präparate beide von der gleichen Tierspezies oder dem gleichen Hersteller stammten oder nicht. Der prozentuale Anteil an gemeinsamen Peaks lag bei zwei verschiedenen KH-Präparaten im Schnitt bei 7,3 % (im Vergleich: 51 % bei unserer Referenzmessung). Überprüften wir drei verschiedene KH-Präparate miteinander, so konnten noch weniger gemeinsame Peptide identifiziert werden, siehe auch Schadow et al. 2017 [90]. Im Schnitt lag hier der Anteil an gemeinsam vorhandenen Peptiden in der vorliegenden Arbeit bei 2 % (im Vergleich: 42 % in unserer Referenzmessung). Auch dies weist darauf hin, dass möglicherweise nicht nur die verwendete Tierspezies, sondern auch die Herstellungsmethoden in hohem Maße Einfluss auf die spezifische Peptidzusammensetzung haben dürften.

**Nicht bei allen KH-Präparat-Anbietern werden Chargen reproduzierbar hergestellt.** Bei dem Vergleich verschiedener Herstellungschargen von CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031), Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06) und Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x) zeigte sich ein heterogenes Bild: Während beim Vergleich der gemeinsam enthaltenen reproduzierbaren Peaks der Mobiforte®- (54 %) und CH-Alpha®-Chargen (41 %) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Referenzmessung ermittelt werden konnten, unterschieden sich die analysierten Peptan® B 2000-Chargen hier signifikant voneinander. Der prozentuale Anteil an gemeinsam enthaltenen Peptiden lag mit 31 % dennoch auch bei den Peptan® B 2000-Chargen deutlich höher als beim Vergleich von zwei verschiedenen KH-Präparaten (durchschnittlich 7,3 %).

Interessanterweise zeigten sich beim Vergleich von drei unterschiedlichen CH-Alpha®-Chargen ebenfalls signifikante Unterschiede in dem Anteil an gemeinsam enthaltenen

Peptiden im Vergleich zur Referenzmessung. Während der prozentuale Anteil an gemeinsam vorhandenen Peptiden bei unserer Referenzmessung 42 % betrug, lag dieser bei den drei CH-Alpha<sup>®</sup>-Chargen lediglich bei 25 %. Die Anzahl an enthaltenen reproduzierbaren Peaks unterschied sich in keiner der von uns untersuchten Chargen innerhalb der verschiedenen KH-Präparate.

Beim Vergleich der Chargen eines KH-Präparates untersuchten wir außerdem mittels ICPL<sup>™</sup>-Markierung, ob gemeinsam in beiden Chargen auftretende KH-Peptide auch in ähnlichen hohen Konzentrationen vorliegen: Lediglich bei den untersuchten Chargen von Mobiforte<sup>®</sup> konnten wir hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu unserer Referenzmessung ermitteln: Sowohl im Chargenvergleich von Mobiforte<sup>®</sup> als auch bei unserer Referenzmessung betrug der Anteil an Peakpaaren mit einem Intensitätsverhältnis  $\geq 0,8$  und  $\leq 1,2$  etwa 78 %. Dies deutet darauf hin, dass die gemeinsam enthaltenen Peptide in dem von uns analysierten Messbereich bei den untersuchten Mobiforte<sup>®</sup>-Chargen tatsächlich in ähnlichen hohen Konzentrationen vorlagen. Bei Analyse der CH-Alpha<sup>®</sup>- und Peptan<sup>®</sup> B 2000-Chargen zeigten sich mit den jeweiligen prozentualen Anteilen von lediglich 47 % bzw. 34 % derjenigen Peakpaare, die ein Intensitätsverhältnis  $\geq 0,8$  und  $\leq 1,2$  besaßen, hingegen signifikante Unterschiede im Vergleich zu unserer Referenzmessung. Somit muss in diesen beiden Fällen davon ausgegangen werden, dass nicht alle enthaltenen KH-Peptide in den jeweiligen beiden Chargen in gleich hohen Konzentrationen vorlagen.

Insgesamt weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass die von uns untersuchten Mobiforte<sup>®</sup>-Chargen reproduzierbar hergestellt wurden. Dahingegen war dies bei den untersuchten CH-Alpha<sup>®</sup>-Chargen trotz identischer Peptidzusammensetzung aufgrund von Unterschieden in den Peptidkonzentrationen nur bedingt und bei den untersuchten Peptan<sup>®</sup> B 2000-Chargen aufgrund von Unterschieden sowohl in der Peptidzusammensetzung als auch den enthaltenen Peptidkonzentrationen nicht der Fall.

### 4.3 Die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf synoviale Fibroblasten

In unserer Studie wurde zum ersten Mal und systematisch die konzentrationsabhängige Wirkung von KH auf humane FLS aus arthrotischen Kniegelenken *in vitro* untersucht. Außerdem testeten wir erstmals die zelluläre Wirkung von verschiedenen Chargen eines KH-Präparates. Dazu untersuchten wir folgende KH-Präparate bzw. deren Chargen:

Mobiforte® (Chargen LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06), Peptan® B 2000 (Chargen LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x), das KH-Präparat Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) sowie das in den Medien häufig hervorgehobene CH-Alpha® (Chargen LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031). Einigen Präparaten waren laut Herstellerangaben Zusatzstoffe beigelegt. So enthielten die untersuchten Mobiforte®-Präparate laut Hersteller zusätzlich Vitamin C und pflanzliches Öl. Das in Form von Trinkampullen im Handel erhältliche CH-Alpha® enthielt Fortigel®, welches mit Vitamin C und weiteren Zusatzstoffen angereichert war. Letzteres erfreute sich seit den Veröffentlichungen von Oesser et al. [73] im Jahr 2003 einer besonders großen Popularität. Alle eingesetzten KH-Präparate waren einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen worden.

Für unsere Studie wurden die FLS mit den verschiedenen Präparaten und deren Chargen in Konzentrationen von 0,05 bis 5 mg/ml für 48 Stunden inkubiert. Nach Einnahme der handelsüblichen Empfehlung von 10 g KH pro Tag dürften die KH-Serumspiegel *in vivo* unter 1 mg/ml liegen; Serumspiegel über 2 mg/ml sind unwahrscheinlich [89, 90]. Die von uns verwendeten Konzentrationen umfassten somit vermutlich auch den physiologisch erzielbaren Bereich und waren ähnlich hoch angesetzt wie in den meisten erfolgten *in vitro*-Studien an Chondrozyten [70, 73, 82, 89, 90].

In unserer Studie konnte in keinem Fall ein stimulierender Effekt mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden, wenngleich sich in einigen Fällen ein Trend zur vermehrten Freisetzung von Zytokinen bzw. Enzymen nach Zugabe von einzelnen KH-Präparaten zeigte. Ein fehlender statistischer Nachweis könnte hierbei auch durch die geringe Probenanzahl bedingt sein. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tab. 22. Auffallend ist, dass die stärksten Freisetzungen von Botenstoffen und Enzymen häufig erst bei KH-Konzentrationen von  $\geq 2$  mg/ml nachweisbar waren. Da diese vermutlich *in vivo* nicht erreicht werden, dürften diese Wirkungen in der klinischen Forschung von geringerer Relevanz sein [89, 90]. Jedoch zeigten die Präparate Peptan® B 2000-Charge Lot-Nr. 1048665 und Peptan® B 5000 teilweise auch in niedrigeren Konzentrationen von 0,1 - 0,5 mg/ml KH Hinweise für stimulatorische Effekte bei der Freisetzung von IL-8, MMP-1 und MMP-3 in die Nährmedien.

Die Ergebnisse unserer Studie können ferner auch deswegen nur mit Einschränkung auf die Wirkung von KH *in vivo* übertragen werden, da neben den noch unbekannten tatsächlich vorliegenden Plasma- und Synoviaspiegeln die eingenommenen KH-Peptide während ihrer Resorption im GIT und ihrer Zirkulation im Blut weiter metabolisiert

werden, sodass nur ein kleiner Teil der Peptide unmodifiziert die Gelenke erreichen dürfte [74, 75, 90, 117]. Am osteoarthritischen Geschehen im Synovium sind überdies nicht nur FLS beteiligt, sondern auch makrophagenähnliche Synoviozyten (Typ-A Synoviozyten) sowie eingewanderte Immunzellen, die in unser Studie nicht berücksichtigt wurden. Weiter wurden in unserer Studie FLS nur über einen relativ kurzen Zeitraum von 48 Stunden mit den KH inkubiert. Da KH jedoch vor allem zur Langzeitprophylaxe eingenommen werden sollen, sind weitere Untersuchungen über einen längeren Zeitraum erforderlich.

	<b>Peptan® B 5000</b>	<b>Peptan® B 2000</b>		<b>CH-Alpha®</b>		<b>Mobiforte®</b>	
<b>LOT-Nr.</b>	<b>1247582</b>	<b>1048665</b>	<b>1266793/x</b>	<b>L115/ 1031</b>	<b>L88/ 1031</b>	<b>11/2016/ L07</b>	<b>11/2016/ L06</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>IL-6</b>	↑	↑	-	↑	↑	-	-
<b>IL-8</b>	↑↑	↑↑	-	-	-	-	-
<b>PGE<sub>2</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>NO</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>MMP-1</b>	↑	↑	-	-	-	-	-
<b>MMP-3</b>	↑↑	↑↑	-	-	-	-	-
<b>MMP-13</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>TIMP-3</b>	-	-	-	↑	↑	-	-

**Tab. 22:** Wirkung von KH auf FLS. In keinem Fall wurde ein statistisch signifikanter stimulierender Effekt nachgewiesen. ↑ = Steigerung, – kein Nachweis einer vermehrten Freisetzung des Zytokins/Enzyms

**Peptan® B 5000, Peptan® B 2000-Charge Lot-Nr. 1048665 und beide CH-Alpha®-Chargen zeigen eine Tendenz zur vermehrten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen.** Sowohl die Inkubation mit den Präparaten Peptan® B 5000 und Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) als auch mit beiden CH-Alpha®-Chargen führte zu einer vermehrten, jedoch nicht statistisch signifikanten Freisetzung von IL-6. Zusätzlich zeigten Peptan® B 5000 und auch Peptan® B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665 einen Trend zur konzentrationsabhängigen Freisetzung von IL-8, der sich im Gegensatz zur IL-6-Freisetzung bei Peptan® B 2000 bereits nach Zugabe von 0,1 mg/ml und bei Pep-

tan<sup>®</sup> B 5000 nach Zugabe von 0,5 mg/ml KH deutlich zeigte und somit möglicherweise auch von klinischer Relevanz ist. Beiden Botenstoffen werden im osteoarthritischen Geschehen modulierende Funktionen mit vorwiegend proinflammatorischer Wirkung beigemessen [28, 41, 78].

Tab. 22 zeigt, dass in keinem der untersuchten Präparate oder deren Chargen eine vermehrte Freisetzung von IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  festgestellt werden konnte. Ebenfalls konnte in keinem Fall ein Anstieg des PGE<sub>2</sub>- oder des NO-Gehalts in den Nährmedien verzeichnet werden. Weder die untersuchten Mobiforte<sup>®</sup>-Chargen noch Peptan<sup>®</sup> B 2000-Charge LOT-Nr. 1266793/x zeigten in den Versuchen eine Wirkung auf die kultivierten FLS.

Die zelluläre Wirkung einiger der analysierten Präparate (Mobiforte<sup>®</sup>, CH-Alpha<sup>®</sup>, Peptan<sup>®</sup> B 2000 und Peptan<sup>®</sup> B 5000) wurde auch von Schadow et al. [89, 90] an Chondrozyten untersucht. In allen Fällen wurden hierbei andere Chargen der Präparate als in der vorliegenden Studie verwendet. Bei Schadow et al. übten mehrere der getesteten Präparate eine proinflammatorische Wirkung auf die kultivierten Chondrozyten aus, siehe Kap.1.3.6.1. Interessanterweise ähnelten sich die Wirkungen der verschiedenen Präparate auf die beiden unterschiedlichen Zelltypen nicht immer: So fiel beispielsweise bei Inkubation der Chondrozyten mit Mobiforte<sup>®</sup> ein Anstieg des NO- sowie des IL-6-Gehalts auf [90], während beide Mobiforte<sup>®</sup>-Chargen in unseren Versuchen an FLS keinerlei proinflammatorische Effekte zeigten. Die Ursachen für die teilweise unterschiedlichen Wirkungen der KH auf die verschiedenen Zelltypen sind unklar und könnten neben den unterschiedlichen, möglicherweise nichtreproduzierbar hergestellten Chargen auch in verschiedenen für die Aktivierung der beiden Zelltypen notwendigen Peptide oder Wirkmechanismen begründet liegen.

**Peptan<sup>®</sup> B 5000, Peptan<sup>®</sup> B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665 zeigen eine Tendenz zur verstärkten Freisetzung von MMPs.** Eine vermehrte Freisetzung verschiedener MMPs, wie MMP-1, -3 und -13, ist eine typische Eigenschaft der entzündlich veränderten Synovialmembran im osteoarthritischen Gelenk [58] und trägt maßgeblich zur Gewebeschädigung und inflammatorischen Reaktion bei [32, 38, 46]. In unseren Versuchen führte die Inkubation der FLS mit Peptan<sup>®</sup> B 5000 und Peptan<sup>®</sup> B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665 zu einer vermehrten Freisetzung von MMP-1 und MMP-3 (Tab. 22),

welche jedoch nicht statistisch signifikant war, möglicherweise auch aufgrund der geringen Probenanzahl. Eine deutliche Tendenz zur vermehrten Freisetzung von MMP-1 bzw. MMP-3 zeigte sich bei Peptan® B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665 bereits nach Zugabe von 0,5 mg/ml bzw. 0,1 mg/ml KH und ist damit möglicherweise auch von klinischer Relevanz. Insgesamt könnte unsere Studie somit in dieselbe Richtung weisen wie frühere Forschungsergebnisse von Ng et al. [70] und Schadow et al. [89, 90], die eine vermehrte Expression und Freisetzung von MMPs nach Inkubation mit KH-Präparaten bei Chondrozyten beobachtet hatten.

Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse erneut mit den Ergebnissen der *in vitro*-Studien von Schadow et al. [89, 90], zeigt sich hierbei bemerkenswerterweise abermals, dass gleiche Präparate nicht zwingend ähnliche Wirkungen auf die beiden untersuchten Zelltypen ausüben müssen: So führte die Inkubation mit Mobiforte® in hohen Konzentrationen bei Schadow et al. [90] zur Freisetzung verschiedener MMPs aus humanen Knorpelimplantaten, während beide Mobiforte®-Chargen keinerlei Einfluss auf die Freisetzung von MMPs bei FLS zeigten.

**CH-Alpha®-Chargen zeigen einen Trend zur vermehrten Freisetzung von TIMP-3 in die Nährmedien.** Lediglich bei den beiden untersuchten CH-Alpha®-Chargen konnte ein Anstieg des TIMP-3-Gehalts in den Nährmedien nachgewiesen werden, welcher jedoch nicht statistisch signifikant war und sich erst nach Zugabe von 2 mg/mL KH deutlich zeigte, sodass die klinische Relevanz unserer Untersuchung zunächst unklar bleibt (Tab. 22). TIMP-3 ist in der OA-Forschung von besonderem Interesse, da es neben der Inaktivierung von MMPs außerdem in der Lage ist, die Aggrecanasen ADAMTS4 und -5 sowie ADAM12 und -17 zu inhibieren [9]. Interessanterweise führte CH-Alpha® in den Studien von Schadow et al. [89] in hohen Konzentrationen zu einer Inhibierung der TIMP-1 Synthese, welche in der vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht analysiert wurde.

**Verschiedene KH-Präparate unterscheiden sich nicht statistisch signifikant in ihrer Wirkung auf FLS.** In keinem Fall konnte eine statistisch signifikant unterschiedliche Wirkung verschiedener KH-Präparate auf FLS nachgewiesen werden. Dennoch zeigten sich diskrete Hinweise, dass die Wirkung von verschiedenen KH-Präparaten auf



FLS differieren könnte: So zeigte sich bei dem Präparat Peptan® B 5000 der Trend einer umfangreichen, wenngleich in unserer Studie statistisch nicht signifikanten proinflammatorischen Wirkung auf die kultivierten FLS, während bei beiden untersuchten Mobiforte®-Chargen in unserer Studie keinerlei stimulatorische Wirkung feststellbar war. Ebenso zeigten sich Hinweise auf Unterschiede zwischen den beiden bovinen KH-Präparaten CH-Alpha® und Peptan® B 2000: Während bei beiden CH-Alpha®-Präparaten eine Tendenz zur vermehrten Freisetzung des Zytokins IL-6 als auch TIMP-3 nachgewiesen werden konnte, zeigten die Peptan® B 2000-Präparate entweder ebenfalls eine stimulierende Tendenz (LOT-Nr. 1048665) oder keinerlei Hinweis auf eine stimulatorischen Wirkung (LOT-Nr. 1266793/x) weitere Studien sind hier zur weiteren Aufklärung erforderlich.

**Verschiedene Chargen eines KH-Präparates zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede in ihrer Wirkung auf FLS.** In keinem Fall konnte eine statistisch signifikant unterschiedliche Wirkung verschiedener KH-Chargen auf FLS nachgewiesen werden. Dennoch fanden sich diskrete Hinweise, dass die Wirkung von verschiedenen KH-Präparaten auf FLS differieren könnte: So konnte bei Peptan® B 2000-Charge LOT-Nr. 1048665 ein deutlicher, wenngleich statistisch nicht signifikanter stimulatorischer Trend beobachtet werden, der mit einer merklichen Erhöhung von IL-6, IL-8 sowie MMP-1 und MMP-3 in den Nährmedien einherging, wohingegen sich bei Inkubation mit Peptan® B 2000-Charge LOT-Nr. 1266793/x keinerlei erhöhte biologische Aktivität zeigte. Weitere, umfassendere Studien sind hier zur weiteren Aufklärung erforderlich.

#### 4.4 Schlussfolgerungen

Unsere Studie zeigt, dass sich verschiedene KH-Präparate deutlich in ihrer biochemischen Peptidzusammensetzung unterscheiden. Unterschiede zeigten sich sowohl beim Vergleich von Präparaten, die von demselben als auch von unterschiedlichen Herstellern produziert wurden, und bestanden unabhängig davon, ob die miteinander verglichenen Präparate aus derselben oder aus unterschiedlichen Tierspezies hergestellt wurden. Die Studie zeigt außerdem zum ersten Mal, dass sich auch verschiedene Chargen eines KH-Präparates deutlich in ihrer Peptidzusammensetzung und Peptidkonzentration

unterscheiden können. Worin diese Unterschiede begründet liegen – etwa im verwendeten Ausgangsmaterial oder im Fertigungsprozess – bleibt derzeit unklar. Da die genauen Herstellungsverfahren von KH bislang weitestgehend unveröffentlicht bleiben, sind hier die Hersteller aufgefordert, mehr Transparenz zu gewähren und, falls erforderlich ihre Herstellungsverfahren zu optimieren. Eine unterschiedliche Zusammensetzung verschiedener KH-Präparate und Chargen könnte ferner auch eine Begründung für die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse, die sich in der Literatur hinsichtlich der Wirkung von KHs finden lassen, darstellen. Unsere Studie bekräftigt in der Folge den bereits von Shadow et al. [89, 90] geäußerten Zweifel, generelle Aussagen über KH als Wirkgruppe treffen zu können.

Bei keinem der untersuchten KH-Präparate konnte eine statistisch signifikante Wirkung auf humane FLS nachgewiesen werden auch wenn sich in einigen Fällen Hinweise für einen stimulatorischen Effekt einzelner KH-Präparate fanden. Ferner konnte in keinem Fall eine statistisch signifikant unterschiedliche biologische Wirkung verschiedener KH-Chargen auf FLS festgestellt werden, wenngleich sich im Zellkulturversuch teilweise Hinweise auf eine mögliche unterschiedliche Wirkung zeigten. Um diese Fragen zufriedenstellend beantworten zu können, sind weitere Studien mit deutlich größerem Probenumfang und weiteren Stoffwechselfparametern erforderlich. Des Weiteren sollte auch die biologische Wirkung verschiedener KHs auf weitere Zelltypen, die im osteoarthritischen Gelenk vorkommen, untersucht werden.

Auch wenn unsere Studie nur mit Einschränkungen auf die deutlicher komplexere Situation *in vivo* übertragen werden kann, verdeutlicht sie die Wichtigkeit weiterer umfassender präklinischer und klinischer Untersuchungen jedes einzelnen im Handel erhältlichen KH-Präparates sowie dessen Chargen. Eine Möglichkeit, sich den komplexen Wirkmechanismen von KH *in vivo* schrittweise zu nähern, stellen auch tierexperimentelle Studien dar. Eine systematische Überprüfung der systemischen Wirkung von KH-Präparaten in präklinischen und klinischen Untersuchungen ist notwendig, um KH als wirksame und sichere Nahrungsergänzungsmittel deklarieren zu können.

## 5 Zusammenfassung

Kollagenhydrolysate (KH) sind Peptidgemische, die als Nahrungsergänzungsmittel bei Arthrose eingesetzt werden. Klinische Effekte von KH gelten bislang als umstritten, wobei Wirkungen auf den Gelenkknorpel beschrieben wurden. Ziel dieser Arbeit war es, erstmalig biochemische Unterschiede von KH-Präparaten bzw. deren Chargen zu quantifizieren und ihre Wirkung auf synoviale Fibroblasten (FLS) zu beschreiben. Hierfür wurden humane FLS aus arthrotischen Kniegelenken für 48 Std. mit den KH-Präparaten Mobiforte®, CH-Alpha®, Peptan® B 2000 und Peptan® B 5000 bzw. deren Chargen in Konzentrationen von 0 – 5 mg/ml inkubiert. Anschließend wurde der Gehalt verschiedener Entzündungsmediatoren (IL-1, IL-6, IL-8, NO, PGE<sub>2</sub>) und Enzymen (MMP-1, MMP-3, MMP-13 und TIMP-3) in den Nährmedien bestimmt. Die Untersuchung der biochemischen Zusammensetzung der KH erfolgte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Hierzu wurden in jedem Präparat die enthaltenen Peptide ermittelt und mit den Peptiden anderer Präparate/Chargen verglichen. Mittels stabiler Isotopen-Markierung (ICPL™) verglichen wir außerdem die enthaltenen Peptidkonzentrationen verschiedener Chargen eines Präparates. Alle Vergleiche von zwei Präparaten zeigten signifikante Unterschiede in der Peptidzusammensetzung mit durchschnittlich lediglich 7 % gemeinsamen Peptiden (Referenz: 51 %). Die Peptidanzahl lag im verwendeten Messbereich zwischen 68 und 196. Interessanterweise zeigten sich auch beim Vergleich verschiedener Chargen, mit Ausnahme von Mobiforte®, Unterschiede: So differierten die beiden Peptan® B 2000-Chargen in der Peptidzusammensetzung (gemeinsame Peptide: 31 %) und in den enthaltenen Peptidkonzentrationen (Anteil an Peptiden mit ähnlich hoher Konzentration: 34 %, Referenz: 78 %). Daneben unterschieden sich auch beide CH-Alpha®-Chargen in den Peptidkonzentrationen (47 %), jedoch nicht in der Peptidzusammensetzung (41 %). In keinem Fall wurde eine signifikante Wirkung von KH auf FLS beobachtet, auch wenn sich z. T. Hinweise auf stimulatorische Effekte bei den Präparaten Peptan® B 5000, einer Peptan® B 2000-Charge und bei beiden CH-Alpha®-Chargen fanden. Umfassendere Studien mit weiteren Stoffwechselfparametern sind hier erforderlich. Unsere Studie zeigt zum ersten Mal, dass sich KH-Präparate und deren Chargen in ihrer biochemischen Zusammensetzung z. T. deutlich unterscheiden. Die Wirkung von KH auf FLS und weitere Gelenkszellen sowie die reproduzierbare Herstellung jedes einzelnen KH-Präparates sollten weiter eingehend untersucht werden.

## 6 Summary

Collagen hydrolysates (CHs) are mixtures of peptides that are used as nutraceuticals for osteoarthritis (OA). However, their clinical effects remain controversial; whereby effects on articular cartilage had been described. The aim of this study was to quantify for the first time biochemical differences of CH-preparations and their batches, and to examine their effects on fibroblast-like synoviocytes (FLS). Therefore human FLS had been incubated from osteoarthritic knees for a period of 48 hours in the presence of the CH preparations Mobiforte®, CH-Alpha®, Peptan® B 2000 and Peptan® B 5000 respectively their batches in concentrations of 0-5 mg/ml. Subsequently, the levels of various inflammatory mediators (IL-1, IL-6, IL-8, NO, PGE<sub>2</sub>) and enzymes (MMP-1, MMP-3, MMP-13, TIMP-3) in the media were determined. Biochemical analysis of the different CHs was performed using MALDI-TOF-mass spectrometry. For this purpose, the peptides contained in each preparation were determined and compared with the peptides of other preparations/batches. Using stable isotope-labeling (ICPL™), we moreover compared the peptide concentrations of different production batches. In all comparisons of two CH-preparations, we found significant differences in the peptide composition with an average of only 7% common peptides (reference: 51%). The number of peptides in the investigated measuring range was between 68 and 196. Interestingly, differences in the biochemical composition of CH were also found when comparing different batches of the same CH preparation, with the exception of Mobiforte®: For example, also the two investigated Peptan® B 2000 batches differed in both their peptidic composition (common peptides: 31%) and the concentrations of the contained peptides (peptides found in similar high concentrations: 34%, reference: 78%). Also both CH-Alpha® batches differed in their peptide concentrations (47%) but not in the peptidic composition (41%). In no case a significant effect of CH on FLS was observed, although some indications of a stimulatory effect of Peptan® B 5000, one Peptan® B 2000 batch and both CH-Alpha® batches could be shown. Thus more extensive studies with further metabolic parameters are required. Our study demonstrates for the first time that CH preparations and their batches may differ significantly in their biochemical composition. The effect of CH on FLS as well as on other cells of the joint and the reproducible production of each individual CH preparation should be further investigated.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ADAM</b>	a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein
<b>ADAMTS</b>	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
<b>AFM</b>	atomic force-microscope, Rasterkraftmikroskop
<b>Aqua dest.</b>	Aqua destillata, destilliertes Wasser
<b>BCA</b>	bicinchoninic acid assay, Bicinchoninsäure-Assay
<b>BMI</b>	body mass index
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>CH</b>	collagen hydrolysate, Kollagenhydrolysat
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>COMP</b>	cartilage oligomeric matrix protein
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>Da</b>	Dalton
<b>DHB</b>	Dihydroxybenzoesäure
<b>DMOAD</b>	disease modifying OA drug
<b>EC<sub>50</sub></b>	half maximal effective concentration, mittlere effektive Konzentration
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>engl.</b>	englisch

<b>EP-2 und -4</b>	Prostaglandin E <sub>2</sub> Rezeptor 2 und 4
<b>etc.</b>	et cetera, und so weiter
<b>EU</b>	Europäische Union
<b>EZM</b>	extrazelluläre Matrix
<b>FACS</b>	fluorescence-activated cell sorting, Fluoreszenz-markierte Durchflusszytometrie
<b>FBS</b>	foetal bovine serum, fetales Kalbserum
<b>FGH</b>	ehemalige Bezeichnung für Peptan® F 5000
<b>FGH-N</b>	ehemalige Bezeichnung für Peptan® F 2000
<b>FLS</b>	fibroblast-like synoviocytes, synoviale Fibroblasten
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>GAG</b>	Glykosaminglykane
<b>GIT</b>	Gastrointestinaltrakt
<b>Gp130</b>	Glykoprotein 130
<b>ICPL™</b>	Isotope Coded Protein Labelling
<b>IGF</b>	insuline-like growth factor
<b>IL</b>	Interleukin
<b>iNOS</b>	induzierbare NO-Synthase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KH</b>	Kollagenhydrolysate
<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit
<b>Koll.</b>	Kollagen

<b>MALDI-TOF</b>	matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight, Matrix assoziierte-Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitanalyse
<b>MDPA</b>	Methylendiphosphosäure
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>Min.</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>m/z</b>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
<b>n</b>	Anzahl Versuchswiederholung
<b>N</b>	Normalität
<b>n. b.</b>	nicht bestimmt
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NemV</b>	Nahrungsmittelverordnung
<b>NF-κB</b>	nuclear factor 'κ-light-chain-enhancer' of activated B-cells
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NL</b>	Niederlande
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NMR</b>	nuclear magnetic-resonance, Kernspinresonanz
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrit

<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrat
<b>NMWL</b>	nominal molecular weight limit, nominelle Molekulargewichtsgrenze
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>NSAR</b>	nichtsteroidales Antirheumatikum
<b>OA</b>	Osteoarthritis
<b>o. g.</b>	oben genannt
<b>P<sub>1-6</sub></b>	Probanden, die für Hauptversuch 3 Gewebereste spendeten
<b>p-Wert</b>	probability (Signifikanzwert)
<b>p. a.</b>	per analysis
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PG</b>	Proteoglykan
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>pg</b>	Pikogramm
<b>PI-Cocktail</b>	Proteaseinhibitor-Cocktail
<b>PI-9</b>	Proteinaseinhibitor-9
<b>ppm</b>	parts per million
<b>Pro-Hyp</b>	Prolin-Hydroxyprolin
<b>PRR</b>	pattern recognition receptor
<b>RDH</b>	ehemalige Bezeichnung für Peptan® B 5000
<b>RDH-N</b>	ehemalige Bezeichnung für Peptan® B 2000
<b>RP-HPLC</b>	reversed phase-high performance liquid chromatography, reverse Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie



<b>rpm</b>	revolutions per minute, Drehzahl
<b>RP-SPE</b>	reversed phase-solid phase extraction, reverse Phase-Festphasen-extraktion
<b>S/N</b>	signal-to-noise ratio, Signal-zu-Rauschverhältnis
<b>SADOA</b>	slow acting drug in OA
<b>SD</b>	standard deviation, Standardabweichung
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>Sek.</b>	Sekunde
<b>sIL-6R</b>	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
<b>Std.</b>	Stunde
<b>SYSADOA</b>	symptomatic slow acting drug in OA
<b>TFA</b>	trifluoroacetic acid, Trifluoressigsäure
<b>TIMP</b>	tissue inhibitor of metalloproteinases
<b>TLR</b>	toll-like-receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>u. a.</b>	unter anderem
<b>UK</b>	United Kingdom
<b>USA</b>	United States of America
<b>VAS</b>	Visuelle Analogskala
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>vs.</b>	versus

<b>WOMAC</b>	Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index
$\bar{x}$	arithmetisches Mittel
$\triangleq$	entspricht
♂	männlich
♀	weiblich

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Aufbereitung der KH-Präparate für Hauptversuch 1 und 2	- 46 -
<b>Abb. 2:</b>	Auswertungsverfahren des Hauptversuchs 3	- 51 -
<b>Abb. 3:</b>	Auswertungsverfahren des Hauptversuchs 1	- 58 -
<b>Abb. 4:</b>	Anzahl Peaks bei unterschiedlichen S/N bei Mobiforte®	- 70 -
<b>Abb. 5:</b>	Gel-like-view-Diagramm: Referenzvergleich Nr. 1	- 76 -
<b>Abb. 6:</b>	Gel-like-view-Diagramm: Referenzvergleich Nr. 2	- 76 -
<b>Abb. 7:</b>	Venn-Diagramm: Referenzvergleich Nr. 2	- 77 -
<b>Abb. 8:</b>	Gel-like-view-Diagramm: Mobiforte® und Peptan® B 2000	- 77 -
<b>Abb. 9:</b>	Gel-like-view-Diagramm: Mobiforte® und CH-Alpha®	- 78 -
<b>Abb. 10:</b>	Gel-like-view-Diagramm: CH-Alpha® und Peptan® B 2000	- 79 -
<b>Abb. 11:</b>	Gel-like-view-Diagramme: Mobiforte®, CH-Alpha® und Peptan® B 2000	- 80 -
<b>Abb. 12:</b>	Venn-Diagramme: Mobiforte®, CH-Alpha® und Peptan® B 2000	- 81 -
<b>Abb. 13:</b>	Gel-like-view-Diagramm: Chargenvergleich von Mobiforte®	- 81 -
<b>Abb. 14:</b>	Gel-like-view-Diagramm: Chargenvergleich von Peptan® B 2000	- 82 -
<b>Abb. 15:</b>	Gel-like-view-Diagramm: Chargenvergleich CH-Alpha®	- 83 -
<b>Abb. 16:</b>	Gel-like-view-Diagramm: Vergleich von 3 CH-Alpha®-Chargen	- 84 -
<b>Abb. 17:</b>	Venn-Diagramm: Chargenvergleich von 3 CH-Alpha®-Chargen	- 85 -
<b>Abb. 18:</b>	Intensitätsverhältnisse Referenzmessung und Chargenvergleiche	- 88 -
<b>Abb. 19:</b>	IL-6 Konzentrations-Wirkungsbeziehung	- 90 -
		- 120 -

---

<b>Abb. 20:</b>	IL-8 Konzentrations-Wirkungsbeziehung	- 91 -
<b>Abb. 21:</b>	MMP-1 Konzentrations-Wirkungsbeziehung	- 92 -
<b>Abb. 22:</b>	MMP-3 Konzentrations-Wirkungsbeziehung	- 92 -
<b>Abb. 23:</b>	TIMP-3 Konzentrations-Wirkungsbeziehung	- 93 -
<b>Abb. 24:</b>	IL-6 und TIMP-3 Charginvergleich CH-Alpha <sup>®</sup>	- 94 -
<b>Abb. 25:</b>	IL-6, IL-8, MMP-1 und MMP3 Charginvergleich Peptan <sup>®</sup>	- 95 -

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	<i>In vitro</i> -Studien mit Kollagenderivaten	- 24 -
<b>Tab. 2:</b>	<i>In vivo</i> -Studien mit Kollagenhydrolysaten	- 28 -
<b>Tab. 3:</b>	Patientenbeschreibung von Spendern für synoviales Gewebe	- 31 -
<b>Tab. 4:</b>	Herstellung Elutionslösung-, Lösungsmittel- und Waschlösung für RP-SPE	- 42 -
<b>Tab. 5:</b>	Herstellung von Lösungsmittel A und B für die RP-HPLC	- 42 -
<b>Tab. 6:</b>	Herstellung von 2 N Salzsäure und 2 N Natronlauge	- 42 -
<b>Tab. 7:</b>	Nährmedium mit 2 % FBS und 10 % FBS	- 43 -
<b>Tab. 8:</b>	Beschreibung der verwendeten KH-Präparate	- 45 -
<b>Tab. 9:</b>	Fraktionierung der Proben mittels RP-HPLC	- 49 -
<b>Tab. 10:</b>	Erfolgte Präparat- und Chargenvergleiche Hauptversuch 1	- 60 -
<b>Tab. 11:</b>	Angaben zu ELISAs (Interleukine)	- 64 -
<b>Tab. 12:</b>	Angaben zu ELISAs (MMPs)	- 65 -
<b>Tab. 13:</b>	Angaben zu ELISAs (TNF- $\alpha$ )	- 65 -
<b>Tab. 14:</b>	Gesamtzahl der ermittelten Peaks in den Replikaten	- 71 -
<b>Tab. 15:</b>	Prozentualer Anteil der reproduzierbaren Peaks in den Replikaten	- 71 -
<b>Tab. 16:</b>	Vergleich ermittelter Standardkurven TIMP-3	- 72 -
<b>Tab. 17:</b>	Prozentualer Anteil reproduzierbarer Peaks bei verschiedenen KH-Präparaten	- 73 -
<b>Tab. 18:</b>	Vergleich des prozentualen Anteils von reproduzierbaren Peaks	- 74 -
<b>Tab. 19:</b>	Darstellung weiterer Chargenvergleiche von CH-Alpha <sup>®</sup>	- 84 -

<b>Tab. 20:</b>	Darstellung weiterer Präparatvergleiche des Herstellers Rousselot	- 86 -
<b>Tab. 21:</b>	Intensitätsverhältnisse der ermittelten Peakpaare	- 87 -
<b>Tab. 22:</b>	Wirkung von KH auf FLS	- 107 -

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16(Suppl. 2):S15-20.
- [2] Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009, 11(3):227.
- [3] Adam M. Positionen und Expertenmeinungen aus klinischer Sicht. In: Beeinflussung des Gelenkknorpels durch Kollagen-Hydrolysat: Ein wissenschaftliches Kompendium. Gelita Health Initiative, Hrsg. Berlin: Neunplus 1 Verlag, 2004:63-71.
- [4] Adam M. Therapie der Osteoarthrose - Welche Wirkungen haben Gelatinpräparate? *Therapiewoche* 1991, 41(38):2456-61.
- [5] Ameye LG, Chee WSS. Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence. *Arthritis Res Ther* 2006, 8(4):R127.
- [6] Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, 20(1):3–25.
- [7] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. Degenerative Gelenkerkrankungen - Therapieempfehlungen der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. *Arzneiverordnung in der Praxis* 2008, Sonderheft 1:22-4.
- [8] Attur M, Al-Mussawir HE, Patel J, Kitay A, Dave M, Palmer G, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E<sub>2</sub> exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor. *J Immunol* 2008, 181(7): 5082–8.
- [9] Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002, 115(Pt 19):3719–27.
- [10] Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005, 64(9):1263–7.

- 
- [11] Benito-Ruiz P, Camacho-Zambrano MM, Carrillo-Arcentales JN, Mestanza-Peralta MA, Vallejo-Flores CA, Vargas-López SV, Villacís-Tamayo RA, Zurita-Gavilanes LA. A randomized controlled trial on the efficacy and safety of a food ingredient, collagen hydrolysate, for improving joint comfort. *Int J Food Sci Nutr* 2009, 60(Suppl. 2):99–113.
- [12] Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage* 2013, 21(1):16–21.
- [13] Berichtigung der Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. Dezember 2006 über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel. <http://www.health-claims-verordnung.de/resources/hcvo-verordnungstext-berichtigt.pdf> (Zugriff: 28.10.2017).
- [14] Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006, 8(6):R187.
- [15] Brenn D, Richter F, Schaible HG. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat: an inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum* 2007, 56(1):351-9.
- [16] Brunner A, Keidel EM, Dosch D, Kellermann J, Lottspeich F. ICPLQuant - A software for non-isobaric isotopic labeling proteomics. *Proteomics* 2010, 10(2):315–26.
- [17] Clark KL, Sebastianelli W, Flechsenhar KR, Aukermann DF, Meza F, Millard RL, Deitch JR, Sherbondy PS, Albert A. 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain. *Curr Med Res Opin* 2008, 24(5):1485–96.
- [18] Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989, 84(2):678–85



- 
- [19] Drenckhahn D, Hunziker E. Knorpelgewebe. In: Anatomie: makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie und Zellbiologie. Benninghoff A, Drenckhahn D, Hrsg. München - Jena: Urban&Schwarzenberg Verlag, 2008:128-33.
- [20] Drenckhahn D. Allgemeine Gelenk- und Knochenlehre. In: Anatomie: makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie und Zellbiologie. Benninghoff A, Drenckhahn D, Hrsg. München - Jena: Urban&Schwarzenberg Verlag, 2008:254-9.
- [21] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claim related to collagen hydrolysate and maintenance of joints pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2011, 9(7):2291.
- [22] European Food Safety Authority. Opinion of the Food Safety Authority on safety of collagen and a processing method for the production of collagen. EFSA J 2005, 174:1-9.
- [23] Fichter M, Körner U, Schömburg J, Jennings L, Cole AA, Mollenhauer J. Collagen degradation products modulate matrix metalloproteinase expression in cultured articular chondrocytes. J Orthop Res 2006, 24(1):63-70.
- [24] Findlay DM, Atkins GJ. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. Curr Osteoporos Rep 2014, 12(1):127–34.
- [25] Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Caterson B, Jones SA. IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. Matrix Biol 2000, 19(6):549-53.
- [26] Gesetzliche Regelungen für Nahrungsergänzungsmittel. Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde e.V. <https://www.bll.de/de/lebensmittel/nahrungsergaenzungsmittel/nem-gesetzliche-regelungen> (Zugriff: 28.10.2017).
- [27] Goggs R, Carter SD, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M, Mobasheri A. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. Vet J 2003, 166(2):140–58
- [28] Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. Arthritis Rheum 2000, 43(9):1916–26.

- 
- [29] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982, 126(1):131–8.
- [30] Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 1879, 12(1):426–8
- [31] Guermazi A, Roemer FW, Hayashi D. Imaging of osteoarthritis: update from a radiological perspective. *Curr Opin Rheumatol* 2011, 23(5):484–91.
- [32] Hashimoto M, Nakasa T, Hikata T, Asahara H. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Medicinal Research Reviews* 2008, 28(3):464–81.
- [33] Hauser K. Extrazelluläre Matrix. In: *Duale Reihe Biochemie*. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, Hrsg. Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme Verlagsgruppe, 2016:404–7.
- [34] Henrotin Y, Lambert C, Couchourel D, Ripoll C, Chiotelli E. Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products. *Osteoarthritis Cartilage* 2011, 19(1):1–21.
- [35] Hunter DJ, Nevitt M, Losina E, Kraus V. Biomarkers for osteoarthritis: current position and steps towards further validation. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2014, 28(1):61–71.
- [36] Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, Higashi A, Kido Y, Nakabo Y, Ohtsuki K. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem* 2005, 53(16):6531–6.
- [37] Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 2000, 63(1):17–31.
- [38] Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics* 2010, 4(3):194–201.

- [39] Jeevithan E, Qingbo Z, Bao B, Wu W. Biomedical and Pharmaceutical Application of Fish Collagen and Gelatin: A Review. *J Nutr Ther* 2013, 2(4):218-27.
- [40] Jennings L, Wu L, King KB, Hammerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J. The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes. *Connective Tissue Res* 2001, 42(1):71–86.
- [41] Jikko A, Wakisaka T, Iwamoto M, Hiranuma H, Kato Y, Maeda T, Fujishita M, Fuchihata H. Effects of interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures. *Cell Biol Int* 1998, 22(9-10):615–21.
- [42] Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2014, 28(1):5–15.
- [43] Jostock T, Müllberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* 2001, 268(1):160–7.
- [44] Kaneko S, Satoh T, Chiba J, Ju C, Inoue K, Kagawa J. Interleukin–6 and interleukin–8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000, 6(2):71–9.
- [45] Kim SK, Byun HG, Park PJ, Shahidi F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2001, 49(6):2992–7.
- [46] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011, 41(2):271–90.
- [47] Laskin DL, Kimura T, Sakakibara S, Riley DJ, Berg RA. Chemotactic activity of collagen-like polypeptides for human peripheral blood neutrophils. *J Leukoc Biol* 1986, 39(3):255–66.
- [48] Leong DJ, Choudhury M, Hirsh DM, Hardin JA, Cobelli NJ, Sun HB. Nutraceuticals: potential for chondroprotection and molecular targeting of osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2013, 14(11):23063–85.
- [49] Li X, Ellman M, Muddasani P, Wang JH, Cs-Szabo G, van Wijnen AJ, Im HJ. Prostaglandin E<sub>2</sub> and its cognate EP receptors control human adult articular car-

- tilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2009, 60(2):513–23.
- [50] Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008, 8(4):303–6.
- [51] Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17(8):971–9.
- [52] Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012, 64(6):1697–707.
- [53] Lopez HL. Nutritional interventions to prevent and treat osteoarthritis. Part II: focus on micronutrients and supportive nutraceuticals. *PM R* 2012, 4(5 Suppl):S155-68.
- [54] Loughlin J. The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status. *Expert Rev Mol Med* 2005, 7(9):1–12.
- [55] Lüllmann-Rauch R; Asan E. Binde- und Stützgewebe. In: Taschenlehrbuch Histologie. Lüllmann-Rauch R, Hrsg. Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme Verlagsgruppe, 2015:150-5.
- [56] Maldonado M, Nam J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *Biomed Res Int* 2013:284873.
- [57] Malemud CJ. Biologic basis of osteoarthritis: state of the evidence. *Curr Opin Rheumatol* 2015, 27(3):289–94.
- [58] Man GS, Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *J Med Life* 2014, 7(1):37–41.
- [59] Mastbergen SC, Bijlsma JW, Lafeber FP. Synthesis and release of human cartilage matrix proteoglycans are differently regulated by nitric oxide and prostaglandin-E<sub>2</sub>. *Ann Rheum Dis* 2008, 67(1):52–8.
- [60] McAlindon TE, Nuite M, Krishnan N, Ruthazer R, Price LL, Burstein D, Griffith J, Flechsenhar K. Change in knee osteoarthritis cartilage detected by delayed

- gadolinium enhanced magnetic resonance imaging following treatment with collagen hydrolysate: a pilot randomized controlled trial. *Osteoarthritis Cartilage* 2011, 19(4):399–405.
- [61] McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, Kinninmonth A, Weidner J, Mumford R, Liew FY. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 1996, 184(4):1519–24.
- [62] Merz D, Liu R, Johnson K, Terkeltaub R. IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene  $\alpha$ /CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation. *J Immunol* 2003, 171(8):4406–15.
- [63] Meszaros E, Malesmud CJ. Prospects for treating osteoarthritis: enzyme-protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity. *Ther Adv Chronic Dis* 2012, 3(5):219–29.
- [64] Mével E, Monfoulet LE, Merceron C, Coxam V, Wittrant Y, Beck L, Guicheux J. Nutraceuticals in joint health: animal models as instrumental tools. *Drug Discov Today* 2014, 19(10):1649–58.
- [65] Micallef L, Rodgers P. eulerAPE: drawing area-proportional 3-Venn diagrams using ellipses. *PLoS One* 2014, 9(7):e101717.
- [66] Mohammad AW, Suhimi NM, Aziz AGKA, Jahim J. Process for Production of Hydrolysed Collagen from Agriculture Resources: Potential for Further Development. *J Appl Sci* 2014, 14(12): 1319–23.
- [67] Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 2000, 30(2):87–99.
- [68] Nasi S, So A, Combes C, Daudon M, Busso N. Interleukin-6 and chondrocyte mineralisation act in tandem to promote experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2016, 75(7):1372–9.
- [69] Neumann E, Riepl B, Knedla A, Lefevre S, Tarner IH, Grifka J, Steinmeyer J, Schölmerich J, Gay S, Müller-Ladner U. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2010, 12(3):R83.

- 
- [70] Ng KW, Saliman JD, Lin EY, Statman LY, Kugler LE, Lo SB, Ateshian GA, Hung CT. Culture duration modulates collagen hydrolysate-induced tissue remodeling in chondrocyte-seeded agarose hydrogels. *Ann Biomed Eng* 2007, 35(11):1914–23.
- [71] Niethard FU, Biberthaler P, Pfeil J. Degenerative Gelenkerkrankungen. In: *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie*. Niethard FU, Biberthaler P, Pfeil J., Hrsg. Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme Verlagsgruppe, 2014:181-6.
- [72] Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral Administration of  $^{14}\text{C}$  Labeled Gelatin Hydrolysate Leads to an Accumulation of Radioactivity in Cartilage of Mice (C57/BL). *J Nutr* 1999, 129(10):1891–5.
- [73] Oesser S, Seifert J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res* 2003, 311(3):393–9.
- [74] Ohara H, Iida H, Ito K, Takeuchi Y, Nomura Y. Effects of Pro-Hyp, a collagen hydrolysate-derived peptide, on hyaluronic acid synthesis using in vitro cultured synovium cells and oral ingestion of collagen hydrolysates in a guinea pig model of osteoarthritis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010, 74(10):2096–9.
- [75] Ohara H, Matsumoto H, Ito K, Iwai K, Sato K. Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J Agric Food Chem* 2007, 55(4):1532-5.
- [76] Oshima G, Shimabukuro H, Nagasawa K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim Biophys Acta* 1979, 566(1):128–37.
- [77] Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001, 44(6):1237–47.
- [78] Pola E, Papaleo P, Pola R, Gaetani E, Tamburelli FC, Aulisa L, Logroscino CA. Interleukin-6 gene polymorphism and risk of osteoarthritis of the hip: a case-control study. *Osteoarthritis Cartilage* 2005, 13(11):1025–8.

- 
- [79] Poonpet T, Honsawek S. Adipokines: Biomarkers for osteoarthritis? *World J Orthop* 2014, 5(3):319–27.
- [80] Postlethwaite AE, Kang AH. Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. *J Exp Med* 1976, 143(6):1299–307.
- [81] Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, 75(2):871-5.
- [82] Raabe O, Reich C, Wenisch S, Hild A, Burg-Roderfeld M, Siebert HC, Arnhold S. Hydrolyzed fish collagen induced chondrogenic differentiation of equine adipose tissue-derived stromal cells. *Histochem Cell Biol* 2010, 134(6):545–54.
- [83] Richtlinie 2002/46/EG, des Europäischen Parlaments und des Rates vom 10. Juni 2002 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Nahrungsergänzungsmittel. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&from=DE> (Zugriff: 28.10.2017).
- [84] Rodriguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1803(1):39–54.
- [85] Rowan AD, Koshy PJ, Shingleton WD, Degnan BA, Heath JK, Vernallis AB, Spaul JR, Life PF, Hudson K, Cawston TE. Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis Rheum* 2001, 44(7):1620–32.
- [86] Sahebjam S, Khokha R, Mort JS. Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of Timp3(-/-) mice. *Arthritis Rheum* 2007, 56(3):905–9.
- [87] Sanchez C, Deberg MA, Bellahcène A, Castronovo V, Msika P, Delcour JP, Crielaard JM, Henrotin YE. Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone. *Arthritis Rheum* 2008, 58(2):442–55.
- [88] Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 2012, 51(2):249–57.

- 
- [89] Schadow S, Siebert HC, Lochnit G, Kordelle J, Rickert M, Steinmeyer J. Collagen metabolism of human osteoarthritic articular cartilage as modulated by bovine collagen hydrolysates. *PLoS One* 2013, 8(1):e53955.
- [90] Schadow S, Simons VS, Lochnit G, Kordelle J, Gazova Z, Siebert HC, Steinmeyer J. Metabolic Response of Human Osteoarthritic Cartilage to Biochemically Characterized Collagen Hydrolysates. *Int J Mol Sci* 2017, 18(1):207.
- [91] Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 2005 5(1):4–15.
- [92] Schmidt W. Bewegungssystem - Grundlagen. In: Duale Reihe Anatomie. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spaniel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzing LJ., Zilch HG, Hrsg. Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme Verlagsgruppe 2014:228-30.
- [93] Scott I, Midha A, Rashid U, Ball S, Walding A, Kerry P, Delaney S, Cruwys S. Correlation of gene and mediator expression with clinical endpoints in an acute interleukin-1 $\beta$ -driven model of joint pathology. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17(6):790–7.
- [94] Seifert J. Kollagen-Hydrolysat und dessen biologische Wirksamkeit. In: Beeinflussung des Gelenkknorpels durch Kollagen-Hydrolysat: Ein wissenschaftliches Kompendium. Gelita Health Initiative, Hrsg. Berlin: Neunplus 1 Verlag, 2004:48-55.
- [95] Shigemura Y, Kubomura D, Sato Y, Sato K. Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion. *Food Chem* 2014, 159:328–32.
- [96] Shimura Y, Kurosawa H, Sugawara Y, Tsuchiya M, Sawa M, Kaneko H, Futami I, Liu L, Sadatsuki R, Hada S, Iwase Y, Kaneko K, Ishijima M. The factors associated with pain severity in patients with knee osteoarthritis vary according to the radiographic disease severity: a cross-sectional study. *Osteoarthritis Cartilage* 2013, 21(9):1179–84.



- [97] Siebert HC, Burg-Roderfeld M, Eckert T, Stötzel S, Kirch U, Diercks T, Humphries MJ, Frank M, Wechselberger R, Tajkhorshid E, Oesser S. Interaction of the  $\alpha 2A$  domain of integrin with small collagen fragments. *Protein Cell* 2010, 1(4): 393–405.
- [98] Silverstein AM, Stefani RM, Sobczak E, Tong EL, Attur MG, Shah RP, Bulinski JC, Ateshian GA, Hung CT. Toward understanding the role of cartilage particulates in synovial inflammation. *Osteoarthritis Cartilage* 2017, 25(8):1353–61.
- [99] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985 150(1):76–85.
- [100] Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2013, 5(2):77–94.
- [101] Spanel-Borowski K, Mayerhofer K. Zytologie und Histologie - Grundlagen. In: *Duale Reihe Anatomie*. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ., Zilch HG, Hrsg. Stuttgart, New York, Delhi, Rio:Thieme Verlagsgruppe 2014:67-8.
- [102] Spanel-Borowski K, Mayerhofer K. Zytologie und Histologie - Grundlagen. In: *Duale Reihe Anatomie*. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ., Zilch HG, Hrsg. Stuttgart, New York, Delhi, Rio:Thieme Verlagsgruppe 2014: 72-4.
- [103] Stannus O, Jones G, Cicuttini F, Parameswaran V, Quinn S, Burgess J, Ding C. Circulating levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis Cartilage* 2010, 18(11):1441–7.
- [104] Steinmeyer J, Kontinen YT. Oral treatment options for degenerative joint disease - presence and future. *Adv Drug Deliv Rev* 2006, 58(2):168–211.

- [105] Stötzel S, Schurink M, Wienk H, Siebler U, Burg-Roderfeld M, Eckert T, Kulik B, Wechselberger R, Sewing J, Steinmeyer J, Oesser S, Boelens R, Siebert HC. Molecular organization of various collagen fragments as revealed by atomic force microscopy and diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Chemphyschem* 2012, 13(13):3117–25.
- [106] Su S, Grover J, Roughley PJ, DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Zafarullah M. Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family in normal and osteoarthritic joints. *Rheumatol Int* 1999, 18(5-6):183–91.
- [107] Sui Y, Lee JH, DiMicco MA, Vanderploeg EJ, Blake SM, Hung HH, Plaas AH, James IE, Song XY, Lark MW, Grodzinsky AJ. Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor  $\alpha$  in immature bovine and adult human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2009, 60(10): 2985–96.
- [108] Sulzbacher I. Osteoarthritis: histology and pathogenesis. *Wien Med Wochenschr* 2013, 163(9-10):212–9.
- [109] Takahashi A, de Andrés MC, Hashimoto K, Itoi E, Oreffo ROC. Epigenetic regulation of interleukin-8, an inflammatory chemokine, in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2015, 23(11):1946–54.
- [110] Tenhumberg S, Waetzig GH, Chalaris A, Rabe B, Seegert D, Scheller J, Rose-John S, Grötzinger J. Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130. *J Biol Chem* 2008, 283(40):27200–7.
- [111] Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res* 2005, 39(8):797–815.
- [112] Tsuchida AI, Beekhuizen M, 't Hart MC, Radstake TR, Dhert WJ, Saris DB, van Osch GJ, Creemers LB. Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovial fluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2014, 16(5):441.
- [113] Van Vijven JP, Luijsterburg PA, Verhagen AP, van Osch GJ, Kloppenburg M, Bierma-Zeinstra SM. Symptomatic and chondroprotective treatment with colla-

- gen derivatives in osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2012, 20(8):809–21.
- [114] Verordnung über Nahrungsergänzungsmittel (Nahrungsergänzungsmittelverordnung - NemV). <https://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/nemv/gesamt.pdf> (Zugriff: 28.10.2017).
- [115] Vuolteenaho K, Moilanen T, Knowles RG, Moilanen E. The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 2007, 36(4):247–58.
- [116] Walrand S, Chiotelli E, Noirt F, Mwewa S, Lassel T. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. *J Agric Food Chem* 2008, 56(17):7790–5.
- [117] Wang L, Wang Q, Qian J, Liang Q, Wang Z, Xu J, He S, Ma H. Bioavailability and bioavailable forms of collagen after oral administration to rats. *J Agric Food Chem* 2015, 63(14):3752–6.
- [118] Wenham CY, Conaghan PG. The role of synovitis in osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2010, 2(6):349–59.

## 11 Tabellarischer Anhang

### 11.1 Hauptversuch 1: Qualitativer Vergleich von KH-Präparaten

#### 11.1.1 Tabellarische Darstellung der reproduzierbaren Peaks der KH-Präparate

Tab. 1: Referenzmessung Nr. 1 - 3 (CH-Alpha® LOT-Nr. L170/1031)

Referenzmessung Nr. 1 CH-Alpha® Anzahl reproduzierbare Peaks: 95	
Fraktion	m/z
05/06	818
05	821
07	841
04	891
05	898
04	913
05	920
05	921
05	937
05	938
06	955
03	976
05	985
07	997
04	1009
07	1014
03/04	1024
06/07	1032
05/06	1048
04	1049
06	1050
04	1064
04	1066
04	1078
04	1080
06	1084
05	1088
06	1089
05	1105
04	1106
03/04	1121
04	1123
07	1136
07	1154
06	1159
05	1223
07	1225
05	1239
04	1245
05	1255
07	1269

Referenzmessung Nr. 2 CH-Alpha® Anzahl reproduzierbare Peaks: 108	
Fraktion	m/z
05/06	818
05	841
05	891
05	913
05/06	920
05/06	921
03	976
03	977
05/06	985
07/08	997
03	1001
04	1009
04	1010
03	1014
07	1014
03/04	1024
06/07	1032
05/06	1048
04	1049
06	1050
04	1064
04	1066
07	1068
03	1071
04	1078
04	1080
04	1106
04	1107
03	1114
03	1121
04	1123
07	1154
06	1159
03	1215
05	1223
07	1225
05	1239
04	1245
05	1255
05	1285
04	1297

Referenzmessung Nr. 3 CH-Alpha® Anzahl reproduzierbare Peaks: 90	
Fraktion	m/z
07	800
05/06	818
05	841
05	898
04	913
05/06	920
05/06	921
05	937
05	938
03/04	976
03/04	977
05/06	985
07	997
04	1009
03	1014
03/04	1024
06/07	1032
05/06	1048
04	1049
06	1050
03	1059
04	1064
04	1066
03	1071
04	1080
04	1081
04	1106
04	1107
03	1114
03	1121
04/05	1123
03/04	1139
07/08	1154
06	1159
05	1223
05/06	1239
04	1245
05	1255
05	1285
03	1298
05/06	1335

05	1285
05	1335
04/05	1336
05	1340
04/05	1350
03/04	1352
05	1356
04	1370
07	1380
06	1398
06	1419
04	1452
05/06	1461
06	1463
05	1478
04	1492
06	1534
07	1545
07	1571
06	1589
04	1636
06	1647
04	1652
06	1660
06/07	1669
06	1685
07	1687
07	1688
04	1692
06	1704
04	1721
04	1732
03	1762
04	1803
03	1843
05	1868
04	1886
05/06	1920
05	1957
03	1977
07	2009
03/04	2019
06	2039
06/07	2055
05	2113
03	2264
04	2366
06	2366
06	2382
06	2398
06	2538
04	2770
04	2997
04	3517

03	1298
04	1305
04/05	1335
04/05	1336
05	1340
04	1354
05	1356
04	1370
07	1380
06	1398
06	1419
04	1437
04	1452
04	1454
06	1460
06	1462
03	1465
03	1477
05/06	1478
05/06	1480
03	1484
04	1492
03	1493
03	1495
06	1532
06/07	1534
07	1545
03	1555
06/07	1589
04	1636
06	1647
04	1652
06/07	1669
06	1685
07	1687
04	1692
06	1704
04	1713
04	1721
04	1732
03	1759
03	1762
04	1803
03	1843
05	1868
04	1887
05/06	1920
05	1957
03	1962
03	1975
03	1977
03	2019
06/07	2055
07	2235
03	2248
03	2266
06	2366
06/07	2382
06/07	2398

04/05	1336
05	1340
05	1356
04	1370
07	1380
06	1398
06	1419
04	1437
04	1452
04	1454
06	1460
06	1462
03/04	1477
05	1478
06	1479
03	1484
04	1492
03	1495
04	1510
06	1534
03	1555
06	1589
04	1636
06	1647
04	1652
06/07	1669
06	1685
05	1688
04	1692
06	1704
04	1713
04	1721
05	1868
04	1887
05/06	1920
05/06	1957
03	1977
03/04	2019
03	2021
06	2055
03	2266
03	2284
06	2366
06	2382
06	2398
06	2538
05/06	2789

06	2465
06	2481
06	2538
05	2564
05	2750
04	2770
05/06	2789
05	2807

**Tab. 1:** Darstellung der reproduzierbaren Peaks von den Referenzmessungen Nr. 1, 2 und 3. Hierfür wurde die CH-Alpha<sup>®</sup>-Charge LOT-Nr. L170/1031 an drei unterschiedlichen Tagen mittels MALDI-TOF-Analyse untersucht. Gewähltes  $S/R \geq 10$ . Gezeigt werden die jeweilige Massenzahl (m/z), gerundet auf ganze Zahlen, und die Fraktion, in der der jeweilige Peak aufgetreten ist.

**Tab. 2:** Reproduzierbare Peaks bei verschiedenen KH-Präparaten

- CH-Alpha<sup>®</sup>, LOT-Nr. L115/1031
- CH-Alpha<sup>®</sup>, LOT-Nr. L88/1031
- Peptan<sup>®</sup> B 5000, LOT-Nr. 1247582

CH-Alpha <sup>®</sup> LOT-Nr. L115/1031. Anzahl reproduzierbare Peaks: 103	
Fraktion	m/z
07	800
05	921
06	955
03/04	958
05	960
03/04	976
08	979
07/08	997
04	1009
03	1014
07/08	1014
04	1024
06/07/08	1032
03	1032
05/06	1048
06	1050
04	1066
03/04	1071
04/05	1080
06	1084
04	1085
06	1089

CH-Alpha <sup>®</sup> LOT-Nr. L88/1031. Anzahl reproduzierbare Peaks: 113	
Fraktion	m/z
07/08	800
06	818
06	831
03	897
05	899
05	920
05/06	921
06	956
04	958
05	960
03	977
05	985
08	997
06	1008
04	1009
03	1014
07/08	1014
04	1024
06/07/08	1032
03	1032
05	1048
06	1048

Peptan <sup>®</sup> B 5000 (LOT-Nr. 1247582) Anzahl reproduzierbare Peaks: 68	
Fraktion	m/z
05/06	818
07	820
05	821
05	823
05	853
05	879
05/06	921
05	927
06	959
08	967
07	985
06/07	1001
04	1009
06	1017
06/07	1032
05/06	1048
04	1049
06	1050
04	1052
06	1056
04/05	1066
04	1080

04/05	1106
08	1112
04	1120
04	1123
07	1154
06	1159
08	1179
07	1205
05/06	1223
07	1225
04	1236
05	1239
04	1245
05	1297
03	1298
05	1305
05/06	1335
04	1352
05	1362
04/05	1370
07	1380
06	1398
06	1419
04	1437
04	1452
04	1455
06/07	1460
04	1477
05/06	1478
03/04	1484
03/04/05	1492
06	1534
07	1545
06	1550
03/04	1555
03	1571
07	1571
03	1584
06	1589
04	1645
06	1647
04	1652
04	1668
07	1669
06/07	1685
07	1687
04	1692
06	1704
04	1721
07	1726
07	1831
04	1833
05	1844
07	1859
04	1886
04	1904

04	1049
06	1050
06	1056
04	1064
04	1066
04/05	1080
04	1085
05	1088
06	1089
03	1090
04	1093
03/04	1096
04/05	1106
05	1107
04	1123
03/04	1139
07	1154
06	1159
07	1206
05/06	1223
07	1225
05	1239
05	1255
03	1268
05	1280
05	1297
05	1305
05/06	1336
05	1340
03	1340
04	1352
04	1354
04/05	1370
07	1380
06/07	1398
05	1403
06	1419
04	1452
04	1455
06	1461
06	1463
03	1464
03/04	1477
05	1478
06	1479
03/04	1484
04/05	1492
06	1500
06	1518
06	1532
06	1534
07	1545
06	1550
07	1571
03	1584
06/07	1589

04/05/06	1087
07	1095
04	1106
04	1108
04	1123
07	1124
04	1137
06/07	1155
05	1164
06	1270
05	1286
05	1332
06	1347
04/05	1350
05	1368
04	1380
06	1398
05	1403
05	1423
05	1431
06	1455
04/05	1465
04	1467
06	1502
06	1518
06	1533
07	1545
06	1589
06	1617
05	1620
07	1633
04/05	1636
04/05	1652
04	1664
07	1669
06	1674
06	1685
06	1759
06	1816
06	1877
05	1957
07	1957
07	1973
07	2207
05	2280
05	2296

06	1920
04	1948
05	1957
04	1961
04	2019
08	2037
06/07	2039
06/07	2055
03/04	2265
04	2343
06/07	2366
04	2366
06	2382
06	2398
06/07	2465
06	2481
05/06	2528
07	2534
06	2538
06	2564
06	2750
06	2789
04	2802
07	3968
07	3984

04	1619
04/05	1636
06	1647
04	1652
06	1660
04	1668
07	1669
06/07	1685
04	1692
06	1704
03	1705
04	1721
04	1732
03	1759
03	1762
06	1913
06	1920
06/07	2055
05	2113
05	2199
04	2343
06/07	2366
06	2382
06	2398
06	2465
06	2481
05	2534
06	2538
06	2564
06	2750
06	2789
06	2797
04	2803
04	3773
07	3969

**Tab. 2:** Darstellung der reproduzierbaren Peaks von CH-Alpha<sup>®</sup> LOT-Nr. L115/1031 und LOT-Nr. L88/1031 sowie Peptan<sup>®</sup> B 5000 (LOT-Nr. 1247582) bei einem gewählten S/R von  $\geq 10$ . Gezeigt werden die jeweilige Massenzahl (m/z), gerundet auf ganze Zahlen, und die Fraktion, in der der jeweilige Peak aufgetreten ist.



Tab. 3: Reproduzierbare Peaks bei verschiedenen KH-Präparaten

- Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1048665
- Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1266793/x
- Peptan® F 2000, LOT-Nr. 1010903

Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) Anzahl reproduzierbare Peaks: 154	
Fraktion	m/z
08	802
04	810
05	811
05	815
07/08	820
05/06	821
06	823
06	828
05	841
05	853
03	854
05	861
06	871
03	871
05/06	879
06	898
03	900
06	926
05	938
04/05	942
03/04	958
06/07	976
03/04	982
03	999
05	999
05	1008
04/05	1021
03	1026
06/07/08	1032
06/07	1048
04/05/06	1049
05/06	1050
04	1064
04	1066
03	1073
05	1078
04	1080
05/06	1089
05	1093
08	1096
03/04	1101
06	1104

Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1266793/x) Anzahl reproduzierbare Peaks: 196	
Fraktion	m/z
04	810
03/04/05	811
03	814
05	815
07	820
04/05/06	821
06	823
05	841
03	853
05	853
03	854
05	861
05	864
05/06	871
03	871
06	873
05	879
06	885
05	891
04	892
03	911
04	922
03	930
06	959
08	967
03	971
05	980
03/04	982
07	985
06	993
04	994
03/04	999
05	999
07	1001
05	1008
04	1009
06	1017
04/05	1021
04	1022
05	1028
05/06	1029
04/05	1036

Peptan® F 2000 (LOT-Nr. 101903) Anzahl reproduzierbare Peaks: 82	
Fraktion	m/z
04	823
06	837
04	837
05/06	841
06/07	848
05/06	856
04/05	859
06/07	895
06	905
06	913
06	917
04	923
05	950
04	968
04	995
04	1033
04	1051
04	1078
05	1094
05	1111
07	1122
03	1141
04	1149
04	1195
06	1203
05	1215
04	1277
03	1283
05	1287
04	1291
04/05	1305
04	1319
05	1343
05	1360
04	1361
06	1366
04	1371
03	1373
05	1376
04	1377
06	1386
04	1387

04/05	1106
05	1108
06	1117
04	1123
04/05	1129
04/05	1137
03	1139
07	1155
03	1156
07	1171
03	1184
07	1187
06	1203
04	1225
04/05	1238
08	1253
06	1276
04	1281
05	1285
08	1324
04/05	1325
04	1335
04	1341
06	1344
05	1350
03	1356
04	1357
05	1362
05	1366
05	1371
05	1372
04	1380
05	1390
03/04	1395
04	1397
04	1410
05	1421
05	1423
08	1431
07	1433
04/05	1437
04/05	1439
07	1442
04	1455
06	1455
06/07	1458
06	1463
04	1464
04	1467
03/04	1471
03/04	1484
05	1490
03	1528
06	1533
04	1539
05	1568

07	1047
04/05/06	1049
04/05	1052
04	1064
04	1066
04	1068
05	1072
05	1076
05	1078
04	1079
04/05	1080
06	1086
04	1086
05/06	1089
07	1091
04	1096
08	1096
06	1104
04/05	1108
06	1113
06	1116
04	1123
08	1124
05	1128
05	1133
04/05	1137
08	1137
03/04	1139
04	1140
05/06	1148
05	1149
07	1155
08	1156
04/05	1164
06	1168
03	1169
07	1171
07	1179
03	1184
07	1187
08	1195
06	1216
06	1221
04	1224
06	1241
07	1250
03	1258
06	1272
06	1276
04	1281
05	1305
04	1322
05	1324
04	1325
03	1329
04	1335

03	1410
05	1411
05	1421
03	1430
04/05	1437
03	1467
05	1468
07	1473
07	1474
05	1490
04	1505
05	1539
06	1572
05	1577
06	1629
06	1645
05	1648
03	1657
06	1661
04/05	1662
05	1679
07	1685
07	1705
06	1723
05	1736
07/08	1742
06	1799
07	1801
07	1817
06	1827
07	1833
07	1858
07	1874
06	1936
07	1937
05/06	1953
07	2039
06	2055
06	2098
04	3145

04	1584
06/07	1605
05	1628
07	1633
03	1635
05	1644
04/05	1656
04	1664
07	1692
03	1697
07	1726
03	1759
04	1760
07	1761
07	1784
03	1800
07	1811
07	1841
05	1844
04	1851
03	1864
03	1866
06/07/08	1877
06	1899
06	1905
07	1909
04	1911
07	1912
03	1915
05	1923
07/08	1939
07/08	1957
07	1973
04	1976
03	2043
07	2067
07/08	2070
04	2139
06	2161
05	2175
05	2207
06	2218
03	2245
05	2274
06	2280
05/06	2296
05	2312
05	2328
05	2514
04	2553
04	2569
08	2637
04	2638
04	2654
04	2682
05	2828

04	1340
06	1344
06	1347
05	1350
04	1357
05	1362
05	1372
05	1374
06	1375
04	1380
05	1385
05	1390
04	1392
04	1395
03	1399
05	1400
04	1410
05	1421
05	1423
08	1431
06	1431
07	1433
04/05	1437
04/05	1439
06/07	1442
05	1443
06	1455
06/07	1458
04/05	1465
04	1467
04	1484
05	1491
06	1500
06	1515
06	1518
06	1533
04	1536
04	1562
04	1565
07	1568
05	1576
06	1589
04	1590
07	1605
05	1628
07	1633
03	1635
05	1644
04	1650
04	1664
06	1689
07	1692
03	1702
04/05	1705
05	1713
05	1715

04	1721
05	1722
07	1726
04	1738
04	1755
03/04	1760
07	1761
07	1785
04	1794
03	1801
05	1831
05	1847
04	1851
03	1864
03	1866
06/07/08	1877
05/06	1889
06	1905
04	1911
03	1916
07/08	1939
07/08	1957
07	1973
04	1976
08	2008
07	2010
07	2026
03	2044
05	2107
06	2161
08	2169
05	2175
04	2195
04	2238
04	2240
05/06	2296
06	2508
05	2514
04	2590
08	2637
04	2709
04	3026

**Tab. 3:** Darstellung der reproduzierbaren Peaks zweier Peptan<sup>®</sup> B 2000-Chargen (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x) sowie Peptan<sup>®</sup> F 2000 (LOT-Nr. 1010903) bei einem gewählten S/R von  $\geq 10$ . Gezeigt werden die jeweilige Massenzahl (m/z), gerundet auf ganze Zahlen, und die Fraktion, in der der jeweilige Peak aufgetreten ist.

Tab. 4: Reproduzierbare Peaks bei verschiedenen KH-Präparaten

- Peptan® F 5000, LOT-Nr. 101372
- Mobiforte®-Charge, LOT-Nr. 11/2016/L07
- Mobiforte®-Charge, LOT-Nr. 11/2016/L06

Peptan® F 5000 (LOT-Nr. 101372) Anzahl reproduzierbare Peaks: 72	
Fraktion	m/z
07	800
05/06	818
07	862
07	878
07	919
06	921
04	922
07	935
06	937
04	937
05	947
07	951
03	954
07	957
05/06	963
05	976
07	1009
05	1058
03	1100
06	1119
06	1175
05	1181
04	1220
06	1252
06	1271
05	1285
04	1321
05/06	1328
05	1342
05	1360
05	1447
06	1475
04	1494
06	1536
06/07	1543
07/08	1554
07	1559
06/07	1572
04	1579
05/06	1584
04	1625

Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07). Anzahl reproduzierbare Peaks: 146	
Fraktion	m/z
05	809
04	810
05/06	821
06	828
07	830
05	837
05	853
05	864
04/05	869
05/06	879
06	882
04	886
06	898
04/05	922
04/05	954
05/06	964
04	966
06/07/08	985
07/08	1001
04/05	1001
04/05	1005
05	1008
04	1011
04	1023
05	1024
05/06	1035
04/05	1036
04/05	1064
04/05	1067
06	1071
05	1076
04/05	1080
04/05/06	1085
05/06	1089
03/04	1101
04/05	1108
06	1117
04/05	1123
06	1132
03/04	1139
04	1140

Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L06). Anzahl reproduzierbare Peaks: 166	
Fraktion	m/z
05	809
04	810
05	821
06	828
05	837
04	841
05	853
05	864
05	879
06	882
04	886
06	898
03	914
04	922
03	930
04	954
05	964
03	971
05	980
06/07	985
07	1001
04	1002
04	1005
05	1008
04	1011
04	1023
05	1024
03	1026
03	1029
04	1036
07	1043
04	1064
04	1067
05	1076
04	1079
04/05	1080
04	1085
05/06	1085
05/06	1089
03	1101
04	1108

05/06	1638
04	1662
05/06	1668
04/05	1684
07	1685
05	1697
04	1700
04	1719
04	1805
04	1821
04	1862
07	1863
06	1866
04	1878
05/06	1882
04	1891
05	1906
03	1931
05/06	1953
04	2034
07	2039
04	2050
04/05	2090
04	2106
04	2114
04	2144
06	2148
05/06	2163
04	2410
04	2541
06	2769

05/06	1148
05	1149
07/08	1161
05/06	1164
03/04	1169
06/07	1171
04	1171
06	1182
07	1187
04/05	1213
06	1241
06	1252
06	1270
05	1304
04/05	1347
07/08	1347
04	1349
04	1351
04/05	1357
06	1361
06	1362
06/07	1375
04/05	1380
07/08	1390
04/05	1403
05/06/07	1406
05/06	1407
06	1414
05	1423
06	1430
07	1437
04/05	1439
05	1447
06	1455
05	1463
04	1464
05	1478
04	1484
05	1490
05/06	1527
04/05	1548
06	1561
04	1565
06	1584
04	1590
07	1608
07	1610
05/06	1612
06	1616
03/04	1624
05/06	1628
07/08	1633
03/04	1642
05	1644
06	1648
04	1649

06	1117
04	1123
04	1126
06	1132
03	1139
04	1140
05/06	1148
07	1161
05	1164
03	1169
06/07	1171
04	1171
06	1171
07	1187
04/05	1188
04	1204
04/05	1213
04	1223
06	1241
04	1250
06	1252
04	1265
06	1270
04	1284
03	1300
05	1304
04	1305
04	1306
08	1329
07	1347
04	1347
04	1357
06	1361
04	1362
04	1364
07/08	1372
06	1375
04	1380
04	1385
07	1390
04	1403
05	1406
06	1414
05	1423
06	1430
04	1439
05	1447
06	1455
05	1463
05	1478
05	1490
03	1498
05	1527
04	1548
06	1561
04	1565

04/05	1656
06/07	1657
05	1661
04/05/6	1664
06/07	1673
05	1678
06/07	1689
03/04	1697
05	1707
05	1715
05	1731
05	1747
03/04	1759
07	1761
07/08	1770
07	1786
05/06	1844
05	1860
06	1863
06/07	1873
04	1874
06/07	1889
03/04	1891
04/05	1905
06/07	1905
07/08	1911
06	1913
05/06	1921
07/08	1945
05	1962
07/08	2013
04	2019
07/08	2050
05/06	2107
05/06	2147
06/07	2193
06/07	2265
06	2281
07	2366
08	2372
06/07	2379
06	2451
08	2475
08	2619
07/08	2637
06	2742
07/08	2743
05	2814
04	2897

04	1569
04	1590
07	1608
06	1612
06/07	1616
04	1620
05	1628
07	1633
04	1635
03	1642
05	1644
06	1648
04	1649
04	1651
04/05	1656
04	1664
06	1673
06	1689
03	1702
05	1715
04	1721
04	1743
04	1745
03	1759
03	1761
07	1761
07	1770
05	1844
04	1853
05	1860
06/07	1873
04	1874
06/07	1889
03/04	1891
06/07	1905
06/07	1908
07	1911
08	1929
07	1929
05	1962
07/08	2013
03	2025
04	2030
F03	2043
07	2050
07	2066
07	2082
05	2107
05/06	2147
05	2161
05	2175
06/07	2193
06/07	2265
06	2281
05	2346
08	2372

06/07	2379
05	2391
06	2451
08	2475
04	2590
08	2636
06	2742
06	2753
05	2874
04	3127
04	3312
07	3331
06/07	3347

**Tab. 4:** Darstellung der reproduzierbaren Peaks der KH-Präparate Peptan<sup>®</sup> F 5000 (LOT-Nr. 101372) und Mobiforte<sup>®</sup> (LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06) bei einem gewählten S/R von  $\geq 10$ . Gezeigt werden die jeweilige Massenzahl (m/z), gerundet auf ganze Zahlen, und die Fraktion, in der der jeweilige Peak aufgetreten ist.



### 11.1.2 Exemplarische ausführliche Darstellung von KH-Präparatvergleichen

Tab. 1: Referenzvergleich Nr. 1 (CH-Alpha® LOT-Nr. L170/1031, gemessen an zwei verschiedenen Zeitpunkten, siehe 2.2.5.4)

Peaks, die in beiden Messungen vorkommen			Peaks nur in Referenzmessung Nr. 1		Peaks nur in Referenzmessung Nr. 2	
Anzahl gemeinsame Peaks: 69			Anzahl Peaks: 26		Anzahl Peaks: 39	
Fraktion	m/z	KH-Präparat	Fraktion	m/z	Fraktion	m/z
05/06	818	Referenzmessung Nr. 2	05	821	03	977
05/06	818	Referenzmessung Nr. 1	05	898	03	1001
			05	937	04	1010
05	841	Referenzmessung Nr. 2	05	938	03	1014
07	841	Referenzmessung Nr. 1	06	955	07	1068
			06	1084	03	1071
04	891	Referenzmessung Nr. 1	05	1088	04	1107
05	891	Referenzmessung Nr. 2	06	1089	03	1114
			05	1105	03	1215
04	913	Referenzmessung Nr. 1	07	1136	04	1297
05	913	Referenzmessung Nr. 2	07	1269	03	1298
			04/05	1350	04	1305
05	920	Referenzmessung Nr. 1	03/04	1352	04	1354
05/06	920	Referenzmessung Nr. 2	05/06	1461	04	1437
			06	1463	04	1454
05/06	921	Referenzmessung Nr. 2	07	1571	06	1460
05	921	Referenzmessung Nr. 1	06	1660	03	1465
			07	1688	03	1477
03	976	Referenzmessung Nr. 2	04	1886	05/06	1480
03	976	Referenzmessung Nr. 1	07	2009	03	1484
			06	2039	03	1493
05	985	Referenzmessung Nr. 1	05	2113	03	1495
05/06	985	Referenzmessung Nr. 2	03	2264	06	1532
			04	2366	03	1555
07/08	997	Referenzmessung Nr. 2	04	2997	04	1713
07	997	Referenzmessung Nr. 1	04	3517	03	1759
					04	1887
04	1009	Referenzmessung Nr. 1			03	1962
04	1009	Referenzmessung Nr. 2			03	1977
					07	2235
07	1014	Referenzmessung Nr. 1			03	2248
07	1014	Referenzmessung Nr. 2			03	2266
					06	2465
03/04	1024	Referenzmessung Nr. 1			06	2481
03/04	1024	Referenzmessung Nr. 2			05	2564
					05	2750
06/07	1032	Referenzmessung Nr. 1			05/06	2789
06/07	1032	Referenzmessung Nr. 2			05	2807
					06	1462
05/06	1048	Referenzmessung Nr. 1				
05/06	1048	Referenzmessung Nr. 2				
04	1049	Referenzmessung Nr. 1				
04	1049	Referenzmessung Nr. 2				

06	1050	Referenzmessung Nr. 2
06	1050	Referenzmessung Nr. 1
04	1064	Referenzmessung Nr. 1
04	1064	Referenzmessung Nr. 2
04	1066	Referenzmessung Nr. 2
04	1066	Referenzmessung Nr. 1
04	1078	Referenzmessung Nr. 1
04	1078	Referenzmessung Nr. 2
04	1080	Referenzmessung Nr. 1
04	1080	Referenzmessung Nr. 2
04	1106	Referenzmessung Nr. 1
04	1106	Referenzmessung Nr. 2
03	1121	Referenzmessung Nr. 2
03/04	1121	Referenzmessung Nr. 1
04	1123	Referenzmessung Nr. 2
04	1123	Referenzmessung Nr. 1
07	1154	Referenzmessung Nr. 2
07	1154	Referenzmessung Nr. 1
06	1159	Referenzmessung Nr. 2
06	1159	Referenzmessung Nr. 1
05	1223	Referenzmessung Nr. 2
05	1223	Referenzmessung Nr. 1
07	1225	Referenzmessung Nr. 2
07	1225	Referenzmessung Nr. 1
05	1239	Referenzmessung Nr. 2
05	1239	Referenzmessung Nr. 1
04	1245	Referenzmessung Nr. 2
04	1245	Referenzmessung Nr. 1
05	1255	Referenzmessung Nr. 2
05	1255	Referenzmessung Nr. 1
05	1285	Referenzmessung Nr. 2
05	1285	Referenzmessung Nr. 1
05	1335	Referenzmessung Nr. 1
05/05	1335	Referenzmessung Nr. 2
04/05	1336	Referenzmessung Nr. 2
04/05	1336	Referenzmessung Nr. 1
05	1340	Referenzmessung Nr. 2
05	1340	Referenzmessung Nr. 1
05	1356	Referenzmessung Nr. 2
05	1356	Referenzmessung Nr. 1
04	1370	Referenzmessung Nr. 2
04	1370	Referenzmessung Nr. 1

07	1380	Referenzmessung Nr. 2
07	1380	Referenzmessung Nr. 1

06	1398	Referenzmessung Nr. 2
06	1398	Referenzmessung Nr. 1

06	1419	Referenzmessung Nr. 2
06	1419	Referenzmessung Nr. 1

04	1452	Referenzmessung Nr. 1
04	1452	Referenzmessung Nr. 2

05/06	1478	Referenzmessung Nr. 2
05	1478	Referenzmessung Nr. 1

04	1492	Referenzmessung Nr. 1
04	1492	Referenzmessung Nr. 2

06/07	1534	Referenzmessung Nr. 2
06	1534	Referenzmessung Nr. 1

07	1545	Referenzmessung Nr. 2
07	1545	Referenzmessung Nr. 1

06	1589	Referenzmessung Nr. 1
06/07	1589	Referenzmessung Nr. 2

04	1636	Referenzmessung Nr. 1
04	1636	Referenzmessung Nr. 2

06	1647	Referenzmessung Nr. 1
06	1647	Referenzmessung Nr. 2

04	1652	Referenzmessung Nr. 2
04	1652	Referenzmessung Nr. 1

06/07	1669	Referenzmessung Nr. 2
06/07	1669	Referenzmessung Nr. 1

06	1685	Referenzmessung Nr. 1
06	1685	Referenzmessung Nr. 2

07	1687	Referenzmessung Nr. 2
07	1687	Referenzmessung Nr. 1

04	1692	Referenzmessung Nr. 1
04	1692	Referenzmessung Nr. 2

06	1704	Referenzmessung Nr. 1
06	1704	Referenzmessung Nr. 2

04	1721	Referenzmessung Nr. 1
04	1721	Referenzmessung Nr. 2

04	1732	Referenzmessung Nr. 2
04	1732	Referenzmessung Nr. 1

03	1762	Referenzmessung Nr. 1
03	1762	Referenzmessung Nr. 2

04	1803	Referenzmessung Nr. 2
----	------	-----------------------

04	1803	Referenzmessung Nr. 1
03	1843	Referenzmessung Nr. 1
03	1843	Referenzmessung Nr. 2
05	1868	Referenzmessung Nr. 2
05	1868	Referenzmessung Nr. 2
05/06	1920	Referenzmessung Nr. 1
05/06	1920	Referenzmessung Nr. 2
05	1957	Referenzmessung Nr. 1
05	1957	Referenzmessung Nr. 2
03	1977	Referenzmessung Nr. 1
03	1977	Referenzmessung Nr. 2
03/04	2019	Referenzmessung Nr. 1
03	2019	Referenzmessung Nr. 2
06/07	2055	Referenzmessung Nr. 1
06/07	2055	Referenzmessung Nr. 2
06	2366	Referenzmessung Nr. 2
06	2366	Referenzmessung Nr. 1
06	2382	Referenzmessung Nr. 1
06/07	2382	Referenzmessung Nr. 2
06	2398	Referenzmessung Nr. 1
06/07	2398	Referenzmessung Nr. 2
06	2538	Referenzmessung Nr. 2
06	2538	Referenzmessung Nr. 1
04	2770	Referenzmessung Nr. 2
04	2770	Referenzmessung Nr. 1

**Tab. 1:** Ausführliche Darstellung des Referenzvergleichs Nr. 1, der Prüfung auf gemeinsame Peaks der beiden Referenzmessungen Nr. 1 und Nr. 2 (CH-Alpha® LOT-Nr. L170/1031, gemessen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten). Gezeigt werden diejenigen Peaks mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ), gerundet in ganzen Zahlen, die gemeinsam in beiden Messungen vorkamen, sowie gesondert diejenigen Peaks, die nur in einer der beiden Messungen gefunden wurden.

Tab. 2: Präparatvergleich von Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07) und Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665)

Peaks, die in beiden KH-Präparaten vorkommen		
Anzahl gemeinsame Peaks: 38		
Fraktion	m/z	KH-Präparat
04	810	Peptan® B 2000
04	810	Mobiforte®

05/06	821	Mobiforte®
05/06	821	Peptan® B 2000

06	828	Mobiforte®
06	828	Peptan® B 2000

05	853	Mobiforte®
05	853	Peptan® B 2000

05/06	879	Mobiforte®
05/06	879	Peptan® B 2000

06	898	Mobiforte®
06	898	Peptan® B 2000

05	1008	Mobiforte®
05	1008	Peptan® B 2000

04/05	1064	Mobiforte®
04	1064	Peptan® B 2000

04	1080	Peptan® B 2000
04/05	1080	Mobiforte®

05/06	1089	Mobiforte®
05/06	1089	Peptan® B 2000

03/04	1101	Peptan® B 2000
03/04	1101	Mobiforte®

05	1108	Peptan® B 2000
04/05	1108	Mobiforte®

06	1117	Mobiforte®
06	1117	Peptan® B 2000

04/05	1123	Mobiforte®
04	1123	Peptan® B 2000

03/04	1139	Mobiforte®
03	1139	Peptan® B 2000

06/07	1171	Mobiforte®
-------	------	------------

Peaks nur in Mobiforte®	
Anzahl Peaks: 108	
Fraktion	m/z
05	809
07	830
05	837
05	864
04/05	869
06	882
04	886
04/05	922
04/05	954
05/06	964
04	966
06/07/08	985
07/08	1001
04/05	1001
04/05	1005
04	1011
04	1023
05	1024
05/06	1035
04/05	1036
04/05	1067
06	1071
05	1076
04/05/06	1085
06	1132
04	1140
05/06	1148
05	1149
07/08	1161
05/06	1164
03/04	1169
04	1171
06	1182
04/05	1213
06	1241
06	1252
06	1270
05	1304
07/08	1347
04/05	1347
04	1349
04	1351
06	1361
06/07	1375
07/08	1390
04/05	1403

Peaks nur in Peptan® B 2000	
Anzahl Peaks: 116	
Fraktion	m/z
08	802
05	811
05	815
07/08	820
06	823
05	841
03	854
05	861
06	871
03	871
03	900
06	926
05	938
04/05	942
03/04	958
06/07	976
03/04	982
03	999
05	999
04/05	1021
03	1026
06/07/08	1032
06/07	1048
06	1049
05/06	1050
04	1066
03	1073
05	1078
05	1093
08	1096
06	1104
04/05	1106
04/05	1129
04/05	1137
07	1155
03	1156
03	1184
06	1203
04	1225
04/05	1238
08	1253
06	1276
04	1281
05	1285
08	1324
04/05	1325

07	1171	Peptan® B 2000
07	1187	Mobiforte®
07	1187	Peptan® B 2000
04/05	1357	Mobiforte®
04	1357	Peptan® B 2000
05	1362	Peptan® B 2000
06	1362	Mobiforte®
04/05	1380	Mobiforte®
04	1380	Peptan® B 2000
05	1423	Peptan® B 2000
05	1423	Mobiforte®
04/05	1439	Mobiforte®
04/05	1439	Peptan® B 2000
06	1455	Peptan® B 2000
06	1455	Mobiforte®
06	1463	Peptan® B 2000
05	1463	Mobiforte®
04	1464	Mobiforte®
04	1464	Peptan® B 2000
03/04	1484	Peptan® B 2000
04	1484	Mobiforte®
05	1490	Peptan® B 2000
05	1490	Mobiforte®
05	1628	Peptan® B 2000
05/06	1628	Mobiforte®
07	1633	Peptan® B 2000
07/08	1633	Mobiforte®
05	1644	Peptan® B 2000
05	1644	Mobiforte®
04/05	1656	Peptan® B 2000
04/05	1656	Mobiforte®
04/05/6	1664	Mobiforte®
04	1664	Peptan® B 2000
03/04	1697	Mobiforte®
03	1697	Peptan® B 2000
03/04	1759	Mobiforte®
03	1759	Peptan® B 2000

05/06/07	1406
05/06	1407
06	1414
06	1430
07	1437
05	1447
05	1478
05/06	1527
04/05	1548
06	1561
04	1565
06	1584
04	1590
07	1608
07	1610
05/06	1612
06	1616
03/04	1624
03/04	1642
06	1648
04	1649
06/07	1657
05	1661
06/07	1673
05	1678
06/07	1689
05	1707
05	1715
05	1731
05	1747
07/08	1770
07	1786
05	1860
06	1863
06/07	1873
04/05	1874
06/07	1889
03/04	1891
06/07	1905
07/08	1911
06	1913
05/06	1921
07/08	1945
05	1962
07/08	2013
04	2019
07/08	2050
05/06	2107
05/06	2147
06/07	2193
06/07	2265
06	2281
07	2366
08	2372
06/07	2379

04	1335
04	1341
06	1344
05	1350
03	1356
05	1362
05	1366
05	1371
05	1372
05	1390
03/04	1395
04	1397
04	1410
05	1421
08	1431
07	1433
04/05	1437
07	1442
04	1455
06/07	1458
04	1467
03/04	1471
03	1528
06	1533
04	1539
05	1568
04	1584
06/07	1605
03	1635
07	1692
07	1726
04	1760
07	1784
03	1800
07	1811
07	1841
04	1851
03	1864
03	1866
06/07/08	1877
06	1899
07	1909
04	1911
07	1912
03	1915
05	1923
07/08	1939
07/08	1957
07	1973
04	1976
03	2043
07	2067
08	2070
04	2139
06	2161

07	1761	Peptan® B 2000
07	1761	Mobiforte®

04/05	1905	Mobiforte®
06	1905	Peptan® B 2000

08	2637	Peptan® B 2000
07/08	2637	Mobiforte®

06	2451
08	2475
08	2619
06	2742
07/08	2743
05	2814
04	2897

05	2175
05	2207
06	2218
03	2245
05	2274
06	2280
05/06	2296
05	2312
05	2328
05	2514
04	2553
04	2569
04	2638
04	2654
04	2682

**Tab. 2:** Vergleich der reproduzierbaren Peaks von Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) und Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07). Dargestellt werden die ermittelten Peaks mit ihrer Massenzahl (m/z), gerundet auf ganze Zahlen und ihrer jeweiligen Fraktionsnummer. Gezeigt werden reproduzierbare Peaks, die in beiden KH-Präparaten gefunden wurden, sowie die reproduzierbaren Peaks, die entweder nur in Peptan® B 2000 oder Mobiforte® gefunden wurden.

## 11.2 Hauptversuch 2: Quantitativer Chargenvergleich mittels ICPL™

Tab. 1: Verteilung der Intensitätsverhältnisse ermittelter Peakpaare bei der Referenzmessung (Mobiforte® LOT-Nr. 11/2016/L07)

m/z	[0,0; 0,2]	[0,2; 0,4]	[0,4; 0,6]	[0,6; 0,8]	[0,8; 1,0]	[1,0; 1,2]	[1,2; 1,4]	[1,4; 1,6]	[1,6; 1,8]	[1,8; 2,0]
935					0,82					
942					0,89					
985				0,79						
991						1,01				
1090						1,17				
1106							1,37			
1129					0,87					
1169					0,92					
1181						1,10				
1190					0,94					
1213						1,13				
1222				0,77						
1228						1,03				
1229							1,21			
1253					0,97					
1269						1,19				
1276						1,09				
1276					0,88					
1293					0,92					
1309					0,88					
1410					0,99					
1423					0,82					
1452					0,88					
1454					0,93					
1508					0,81					
1552					0,81					
1632								1,58		
1666						1,13				
1778								1,53		
1802					0,86					
1852					0,99					
1949						1,07				
2015			0,41							
2067					0,95					
2118						1,02				
2212				0,76						
2266					0,83					
2385				0,80						
2470						1,03				
2589						1,17				
Häufigkeit	0	0	1	4	19	12	2	2	0	0

**Tab. 1:** Verteilung der Intensitätsverhältnisse des Referenzwertes (Mobiforte® Lot-Nr. 11/2016/L07, siehe auch 2.2.6.1), dargestellt in Intervallen von [0,2]. Gezeigt werden die aus den drei Replikaten ermittelten reproduzierbaren Intensitätsverhältnisse der Peakpaare. Die auf ganze Zahlen gerundete Massenzahl



(m/z) gibt das jeweilige Gewicht der mit ICPL<sup>TM</sup>-0-Reagenz-markierten Peaks an. Insgesamt wurden 40 Peakpaare ermittelt. Ein Wert von 1,0 ( $\pm 0,2$ ) bedeutet, dass die Intensitäten gleich hoch sind und somit die Menge an KH-Peptiden in beiden Chargen gleich ist [16].

Tab. 2: Verteilung der Intensitätsverhältnisse ermittelter Peakpaare bei zwei Chargen von Peptan<sup>®</sup> B 2000 (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x)

m/z	[0,0; 0,2]	[0,2; 0,4]	[0,4; 0,6]	[0,6; 0,8]	[0,8; 1,0]	[1,0; 1,2]	[1,2; 1,4]	[1,4; 1,6]	[1,6; 2,8]	[2,8; 3,0]	[3,0; 3,2]	[3,2; 5,2]	[5,0; 5,2]
869			0,56										
884			0,41										
884			0,41										
894						1,03							
916								1,51					
920							1,37						
928								1,48					
946					0,89								
975							1,21						
1005			0,50										
1016					0,91								
1064			0,47										
1119						1,10							
1128											3,14		
1154			0,46										
1171					0,93								
1211			0,54										
1228													5,20
1229			0,58										
1276		0,39											
1292		0,29											
1365						1,16							
1390			0,42										
1426						1,17							
1495					0,82								
1538					0,86								
1623				0,80									
1673										2,92			
1710			0,44										
1836					0,81								
1865			0,44										
1936					0,81								
1964				0,78									
1970					0,88								
2185		0,38											
2251		0,31											
2350					0,82								
2417			0,54										
Häufigkeit	0	4	12	2	9	4	2	2		1	1		1

**Tab. 2:** Verteilung der Intensitätsverhältnisse des Chargenvergleiches von Peptan<sup>®</sup> B 2000 (LOT-Nr. 1048665 und 1266793/x), dargestellt in Intervallen von

[0,2]. Gezeigt werden die aus den drei Replikaten ermittelten reproduzierbaren Intensitätsverhältnisse der Peakpaare. Die auf ganze Zahlen gerundete Massenzahl ( $m/z$ ) gibt das jeweilige Gewicht der mit ICPL™-0-Reagenz-markierten Peaks an. Insgesamt wurden 38 Peakpaare ermittelt. Ein Wert von 1,0 ( $\pm 0,2$ ) bedeutet, dass die Intensitäten gleich hoch sind und somit die Menge an KH-Peptiden in beiden Chargen gleich ist [16]. Die grau eingefärbten Kästchen geben zusammenfassend jeweils unterschiedliche Intervalle an, in welchen sich keine Intensitätsverhältnisse fanden.

Tab. 3: Verteilung der Intensitätsverhältnisse ermittelter Peakpaare bei dem Chargenvergleich von Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06)

$m/z$	[0,0; 0,2]	[0,2; 0,4]	[0,4; 0,6]	[0,6; 0,8]	[0,8; 1,0]	[1,0; 1,2]	[1,2; 1,4]	[1,4; 1,6]	[1,6; 1,8]	[1,8; 2,0]
833						1,18				
890			0,49							
915						1,11				
942					0,98					
946								1,48		
959					0,92					
988					0,99					
1048			0,55							
1070					0,95					
1072					1,00					
1090					0,94					
1099							1,31			
1106					0,98					
1129					0,93					
1148						1,07				
1150				0,63						
1181					0,95					
1190					0,97					
1215					0,95					
1228						1,02				
1229						1,01				
1253					0,93					
1269						1,10				
1292					0,87					
1293					0,93					
1304					0,97					
1309					0,92					
1367						1,10				
1454						1,06				
1511					0,92					
1560					0,90					
1585					0,89					
1632						1,20				
1632						1,20				
1749					0,98					
1778							1,21			
1783							1,33			
1802					0,98					
1852						1,10				

1871					0,96					
1965						1,04				
1996					0,90					
2015			0,47							
2067					0,98					
2073				0,74						
2118					0,90					
2124						1,15				
2171						1,17				
2212				0,75						
2266					0,92					
2369				0,83						
2403					0,94					
2470					0,94					
2475							1,24			
2491						1,11				

Häufigkeit	0	0	3	4	28	15	4	1	0	0
------------	---	---	---	---	----	----	---	---	---	---

**Tab. 3:** Häufigkeitsverteilung der Intensitätsverhältnisse des Chargenvergleiches von Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016/L07 und 11/2016/L06), dargestellt in Intervallen von  $[0,2]$ . Gezeigt werden die aus den drei Replikaten ermittelten reproduzierbaren Intensitätsverhältnisse der Peakpaare. Die auf ganze Zahlen gerundete Massenzahl ( $m/z$ ) gibt das jeweilige Gewicht der mit ICPL™-0-Reagenzmarkierten Peaks an. Insgesamt wurden 55 Peakpaare ermittelt. Ein Wert von  $1,0 (\pm 0,2)$  bedeutet, dass die Intensitäten gleich hoch sind und somit die Menge an KH-Peptiden in beiden Chargen gleich ist [16].

Tab. 4: Verteilung der Intensitätsverhältnisse gefundener Peakpaare bei dem Chargenvergleich von CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031)

$m/z$	$[0,0; 0,2]$	$[0,2; 0,4]$	$[0,4; 0,6]$	$[0,6; 0,8]$	$[0,8; 1,0]$	$[1,0; 1,2]$	$[1,2; 1,4]$	$[1,4; 1,6]$	$[1,6; 1,8]$	$[1,8; 2,0]$
902					1,00					
963				0,80						
1019					0,96					
1043						1,16				
1082									1,79	
1090				0,68						
1128										1,91
1154					0,84					
1155				0,77						
1185					0,91					
1211				0,79						
1228					0,82					
1344					0,92					
1410				0,77						
1440					0,86					
1475				0,79						
1503				0,72						
1503				0,77						
1524			0,49							
1662			0,58							

1694					0,84					
1809			0,52							
1846						1,01				
1879				0,74						
1943					0,95					
2062					0,90					
2130		0,36								
2323							1,34			
2449					0,85					
2503					0,81					

Häufigkeit	0	1	3	9	12	2	1	0	1	1
------------	---	---	---	---	----	---	---	---	---	---

**Tab. 4:** Häufigkeitsverteilung der Intensitätsverhältnisse des Chargenvergleiches von CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031 und L88/1031), dargestellt in Intervallen von [0,2]. Gezeigt werden die aus den drei Replikaten ermittelten reproduzierbaren Intensitätsverhältnisse der Peakpaare. Die angegebene Massenzahl (m/z) gibt das jeweilige Gewicht der mit ICPL™-0-Reagenz-markierten Peaks an. Insgesamt wurden 30 Peakpaare ermittelt. Ein Wert von 1,0 ( $\pm 0,2$ ) bedeutet, dass die Intensitäten gleich hoch sind und somit die Menge an KH-Peptiden in beiden Chargen gleich ist [16].

### 11.3 Hauptversuch 3: Zelluläre Wirkung der KH-Präparate auf kultivierte humane synoviale Fibroblasten

#### 11.3.1 IL-6-Gehalt in den Nährmedien

Tab. 1: IL-6-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 5000, LOT-Nr. 1247582

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,4	n. b.	3,0	2,0	0,4	0,5	0,3
P <sub>2</sub>	0,5	2,7	2,5	0,3	0,6	0,3	n. b.
P <sub>3</sub>	0,9	3,1	1,5	2,0	1	0,8	n. b.
P <sub>4</sub>	0,1	7,4	1,2	3,3	1,6	0,4	n. b.
P <sub>5</sub>	1,3	8,5	3,3	4,3	2,8	1,1	n. b.
P <sub>6</sub>	0,3	2,7	1,7	2,2	0,7	0,3	n. b.
$\bar{x}$	0,6	4,9	2,2	2,4	1,2	0,6	
SD	0,4	2,8	0,8	1,4	0,9	0,3	

Tab. 2: IL-6-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1266793/X

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,5	n. b.	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3
P <sub>2</sub>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,2	n. b.
P <sub>3</sub>	1,2	1,5	1,0	2,1	0,8	1,1	n. b.
P <sub>4</sub>	0,2	0,4	0,3	0,1	0,2	0,1	n. b.
P <sub>5</sub>	1,1	1,8	0,3	0,6	0,4	0,8	n. b.
P <sub>6</sub>	0,3	0,6	0,3	0,4	0,3	0,5	n. b.
$\bar{x}$	0,6	0,9	0,5	0,7	0,4	0,5	
SD	0,4	0,7	0,3	0,7	0,2	0,4	

**Tab. 1 und 2:** Normalisierter Gehalt von IL-6 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) und Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1266793/X) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel ( $= \bar{x}$ ) und die Standardabweichung (engl. standard deviation, SD); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 3: IL-6-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1048665

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,5	n. b.	2,8	3,2	0,7	2,1	1,5
P <sub>2</sub>	0,5	2,3	2,8	0,5	1,6	1,4	n. b.
P <sub>3</sub>	0,9	1,9	2,5	1,5	1,1	0,8	n. b.
P <sub>4</sub>	0,3	9,6	11,8	10,1	10,7	6,2	n. b.
P <sub>5</sub>	0,3	2,1	5	4,6	5,7	2,3	n. b.
P <sub>6</sub>	0,6	2,9	4,1	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	0,5	3,8	4,8	4,0	4,0	2,6	
SD	0,2	3,3	3,6	3,8	4,3	2,1	

Tab. 4: IL-6-Gehalt in den Nährmedien bei CH-Alpha®, LOT-Nr. L88/1031

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,6	n. b.	0,7	0,8	0,5	0,4	0,7
P <sub>2</sub>	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	n. b.
P <sub>3</sub>	0,7	1,7	1,4	1,4	0,7	0,9	n. b.
P <sub>4</sub>	0,3	0,6	0,6	0,5	0,3	0,3	n. b.
P <sub>5</sub>	1,1	0,9	1,4	1,2	2,3	0,6	n. b.
P <sub>6</sub>	0,3	0,6	0,4	0,2	0,3	0,4	n. b.
$\bar{x}$	0,6	0,8	0,8	0,7	0,7	0,5	
SD	0,3	0,5	0,4	0,5	0,8	0,2	

**Tab. 3 und 4:** Normalisierter Gehalt von IL-6 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Peptan® B 2000 (LOT-Nr.1048665) und CH-Alpha® (LOT-Nr. L88/1031) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 5: IL-6-Gehalt in den Nährmedien bei CH-Alpha<sup>®</sup>, LOT-Nr. L115/1031

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,6	n. b.	1,2	1,1	0,5	0,5	0,6
P <sub>2</sub>	0,5	0,9	0,8	0,3	0,3	0,4	n. b.
P <sub>3</sub>	0,7	4,1	1,9	2,2	1,4	0,9	n. b.
P <sub>4</sub>	0,2	0,9	0,5	0,3	0,2	0,2	n. b.
P <sub>5</sub>	0,4	3,7	1,1	0,7	0,7	0,6	n. b.
P <sub>6</sub>	0,2	0,7	0,7	0,3	0,1	0,2	n. b.
$\bar{x}$	0,4	2,1	1	0,8	0,5	0,5	
SD	0,2	1,7	0,5	0,7	0,5	0,3	

Tab. 6: IL-6-Gehalt in den Nährmedien bei Mobiforte<sup>®</sup>, LOT-Nr. 11/2016L06

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]	IL-6 [pg]/Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,4	n. b.	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3
P <sub>2</sub>	0,4	0,5	0,4	0,4	0,2	0,2	n. b.
P <sub>3</sub>	1,2	1,1	2	0,9	1	1,8	n. b.
P <sub>4</sub>	0,4	0,4	0,5	0,4	0,2	0,2	n. b.
P <sub>5</sub>	0,7	0,3	0,6	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
P <sub>6</sub>	0,8	0,6	0,5	0,9	0,3	0,5	n. b.
$\bar{x}$	0,6	0,6	0,7	0,6	0,4	0,6	
SD	0,3	0,3	0,6	0,3	0,3	0,7	

**Tab. 5 und 6:** Normalisierter Gehalt von IL-6 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von CH-Alpha<sup>®</sup> (LOT-Nr. L115/1031) und Mobiforte<sup>®</sup> (LOT-Nr. 11/2016L06) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 7: IL-6-Gehalt in den Nährmedien bei Mobiforte®, LOT-Nr. 11/2016L07

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-6 [pg]/ Protein [µg]	IL-6 [pg]/ Protein [µg]	IL-6 [pg]/ Protein [µg]	IL-6 [pg]/ Protein [µg]	IL-6 [pg]/ Protein [µg]	IL-6 [pg]/ Protein [µg]	IL-6 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,8	n. b.	1,6	1,7	0,5	1,6	1
P <sub>2</sub>	0,5	1,5	1,6	0,3	1,2	0,6	n. b.
P <sub>3</sub>	2,9	1,3	0,9	1	1,9	1,3	n. b.
P <sub>4</sub>	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	n. b.
P <sub>5</sub>	0,5	0,5	0,4	0,3	1	0,8	n. b.
P <sub>6</sub>	0,3	0,4	0,5	0,4	0,5	0,2	n. b.
$\bar{x}$	0,9	0,8	0,9	0,7	0,9	0,8	
SD	1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	

**Tab. 7:** Normalisierter Gehalt von IL-6 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016L07) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

### 11.3.2 IL-8-Gehalt in den Nährmedien

Tab. 1: IL-8-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 5000, LOT-Nr. 1247582

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,4	n. b.	10,8	11,2	0,2	0,7	0,4
P <sub>2</sub>	1,2	10,2	8,6	3,7	4,9	1,5	n. b.
P <sub>3</sub>	0,3	3,1	2,4	1,6	0,6	0,8	n. b.
P <sub>4</sub>	0,1	48,7	51,4	24,3	10,7	2,4	n. b.
P <sub>5</sub>	10,4	54,3	16,3	17,2	14,3	8,8	n. b.
P <sub>6</sub>	7,1	45,4	40,2	34,5	14,3	10,1	n. b.
$\bar{x}$	3,3	32,4	21,6	15,4	7,5	4,1	
SD	4,4	23,8	19,6	12,6	6,5	4,3	

**Tab. 1:** Normalisierter Gehalt von IL-8 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.



Tab. 2: IL-8-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1266793/X

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,4	n. b.	0,5	0,6	0,1	0,2	0,2
P <sub>2</sub>	1,2	1,4	1,8	2,4	0,7	0,8	n. b.
P <sub>3</sub>	0,8	1,3	1,1	2,8	0,8	0,7	n. b.
P <sub>4</sub>	0,1	2	1,4	0,4	1	0,2	n. b.
P <sub>5</sub>	15,5	16,9	1,4	6,1	2	9,2	n. b.
P <sub>6</sub>	5,3	8,5	6,1	6,2	5,5	8,7	n. b.
$\bar{x}$	3,9	6	2	3,1	1,7	3,3	
SD	6	6,8	2	2,6	2	4,4	

Tab. 3: IL-8-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1048665

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,2	n. b.	11	12	0,7	7,9	6,8
P <sub>2</sub>	0,7	11,2	11,6	10,7	13,7	1,7	n. b.
P <sub>3</sub>	0,6	2,8	5,2	5	2,5	2,3	n. b.
P <sub>4</sub>	0	67,4	82,7	67,5	95,3	66	n. b.
P <sub>5</sub>	8,1	35	30,3	41,9	32,5	21,4	n. b.
P <sub>6</sub>	5,1	44,7	62,9	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	2,5	32,2	33,9	27,4	28,9	19,9	
SD	3,4	26	31,9	26,6	39,2	27	

**Tab. 2 und 3:** Normalisierter Gehalt von IL-8 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Peptan® B 2000-Chargen (LOT-Nr. 1266793/x und 1048665) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 4: IL-8-Gehalt in den Nährmedien bei CH-Alpha®, LOT-Nr. L88/1031

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,3	n.b.	0,2	0,7	0,2	0,2	1,1
P <sub>2</sub>	1,8	7,7	1,5	2,0	2,9	2,1	n. b.
P <sub>3</sub>	0,2	1,1	1,7	1,5	0,8	0,5	n. b.
P <sub>4</sub>	0,4	2,1	1,2	0,6	0,5	0,6	n. b.
P <sub>5</sub>	21,1	7	11,3	11,0	29,5	4,7	n. b.
P <sub>6</sub>	7,3	10,5	6	4,9	7,2	8,9	n. b.
$\bar{x}$	5,2	5,7	3,6	3,4	6,9	2,8	
SD	8,3	4	4,2	4,0	11,4	3,4	

Tab. 5: IL-8-Gehalt in den Nährmedien bei CH-Alpha®, LOT-Nr. L115/1031

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,2	n. b.	0,8	0,7	0,2	0,3	0,3
P <sub>2</sub>	2,2	3,9	1,9	2,9	1,1	1,6	n. b.
P <sub>3</sub>	1,1	2,1	1,4	1,3	0,8	0,8	n. b.
P <sub>4</sub>	0,3	1,8	0,5	0,3	0,5	0,5	n. b.
P <sub>5</sub>	1,1	5,4	1,5	0,8	0,8	1,8	n. b.
P <sub>6</sub>	5,7	7,5	9,6	4,6	1,8	2,5	n. b.
$\bar{x}$	1,8	4,1	2,6	1,8	0,9	1,3	
SD	2,1	2,4	3,5	1,7	0,6	0,8	

**Tab. 4 und 5:** Normalisierter Gehalt von IL-8 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von den CH-Alpha®-Chargen (LOT-Nr. L88/1031 und 115/1031) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1</sub>-P<sub>6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 6: IL-8-Gehalt in den Nährmedien bei Mobiforte®, LOT-Nr. 11/2016L06

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,2	n. b.	0,2	0,4	0,3	0,2	0,2
P <sub>2</sub>	1,2	1,8	1,4	1,2	1,1	1,1	n. b.
P <sub>3</sub>	0,5	1,9	0,9	1,0	0,5	0,5	n. b.
P <sub>4</sub>	1,1	1,9	1,3	0,6	0,8	0,6	n. b.
P <sub>5</sub>	5,4	2,5	3	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
P <sub>6</sub>	6,6	8,2	7,1	13	4,2	5,6	n. b.
$\bar{x}$	2,5	3,3	2,3	3,3	1,4	1,6	
SD	2,8	2,8	2,5	5,4	1,6	2,3	

Tab. 7: IL-8-Gehalt in den Nährmedien bei Mobiforte®, LOT-Nr. 11/2016L07

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]	IL-8 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	0,4	n. b.	1,9	3,4	0,1	2,8	1,9
P <sub>2</sub>	1,7	1,3	1,4	3,2	1,2	1,6	n. b.
P <sub>3</sub>	1,7	1,1	1,0	1,1	1,7	0,9	n. b.
P <sub>4</sub>	0,5	1,4	1,2	0,6	0,4	0,3	n. b.
P <sub>5</sub>	2,7	1,7	1,5	1,2	18,1	7,4	n. b.
P <sub>6</sub>	6,4	8,4	7,7	4,7	10,6	5,5	n. b.
$\bar{x}$	2,3	2,8	2,4	2,3	5,4	3,1	
SD	2,2	3,2	2,6	1,6	7,4	2,8	

**Tab. 6 und 7:** Normalisierter Gehalt von IL-8 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von den Mobiforte®-Chargen (LOT-Nr. 11/2016L06 und 11/2016L07) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1</sub>-P<sub>6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

## 11.3.3 MMP-1-Gehalt in den Nährmedien

Tab. 1: MMP-1-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 5000, LOT-Nr. 1247582

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	1,8	n. b.	42,6	27,7	1,6	5,2	2,1
P <sub>2</sub>	1,7	16,1	12,4	6,1	6,5	2,4	n. b.
P <sub>3</sub>	1,5	3,4	3,6	3,1	2	3	n. b.
P <sub>4</sub>	1,2	13,5	10,9	6,1	2,5	0,9	n. b.
P <sub>5</sub>	1	12,8	5,1	8,7	5,1	1,3	n. b.
P <sub>6</sub>	1,4	25,8	19,3	16,2	3,1	1,8	n. b.
$\bar{x}$	1,4	14,3	15,6	11,3	3,4	2,4	
SD	0,3	8	14,3	9,2	1,9	1,6	

Tab. 2: MMP-1-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1266793/X

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	2,8	n. b.	3,7	3,9	1,5	1,0	1,4
P <sub>2</sub>	2,2	1,4	2,7	3,1	1,4	1,4	n. b.
P <sub>3</sub>	1,5	1,7	1,7	1,9	0	0,0	n. b.
P <sub>4</sub>	0,7	0,4	1,3	0,7	0,9	0,7	n. b.
P <sub>5</sub>	0,6	1,1	n. b.	0,1	n. b.	n. b.	n. b.
P <sub>6</sub>	0	0,4	0,4	0,2	0,3	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	1,3	1	1,9	1,7	0,8	0,8	
SD	1,1	0,6	1,3	1,6	0,7	0,6	

**Tab. 1 und Tab. 2:** Normalisierter Gehalt von MMP-1 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) und Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1266793/X) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 3: MMP-1-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1048665

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	1,4	n. b.	18,7	20	3,4	10,6	7
P <sub>2</sub>	1,7	19,8	18,5	14,2	18,3	4,2	n. b.
P <sub>3</sub>	1,6	2,4	3,1	4,1	2,7	2,1	n. b.
P <sub>4</sub>	0,6	13,3	2,9	5,1	9,1	4,5	n. b.
P <sub>5</sub>	0,1	10	9,6	13,1	10,5	n. b.	n. b.
P <sub>6</sub>	0,5	23,7	22,3	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	1,0	13,9	12,5	11,3	8,8	5,3	
SD	0,7	8,3	8,4	6,7	6,3	3,6	

Tab. 4: MMP-1-Gehalt in den Nährmedien bei CH-Alpha®, LOT-Nr. 88/1031

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	1,7	n. b.	1,6	2,6	1,7	1,6	2
P <sub>2</sub>	2,5	6,8	2,2	3,7	5,6	2,4	n. b.
P <sub>3</sub>	1,1	2,3	4,6	2,9	2,5	2,6	n. b.
P <sub>4</sub>	n. b.	0,2	0,1	0,1	0	n. b.	n. b.
P <sub>5</sub>	0,4	0,5	0,6	0,5	2,3	n. b.	n. b.
P <sub>6</sub>	0,3	0,5	0,3	0,4	0,2	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	1,2	2,1	1,6	1,7	2,1	2,2	
SD	0,9	2,8	1,7	1,5	2	0,5	

**Tab. 3 und 4:** Normalisierter Gehalt von MMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) und CH-Alpha® (LOT-Nr. 88/1031) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 5: MMP-1-Gehalt in den Nährmedien bei CH-Alpha®, LOT-Nr. L115/1031

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	1,6	n. b.	2,2	2,8	1,1	1,8	1,8
P <sub>2</sub>	1,1	2,7	2,3	4,2	0	2	n. b.
P <sub>3</sub>	2,7	3,2	2,6	1,3	0	0	n. b.
P <sub>4</sub>	n. b.	0,3	0,1	0,1	0	n. b.	n. b.
P <sub>5</sub>	n. b.	0,2	0,1	0	0	n. b.	n. b.
P <sub>6</sub>	0,1	0,6	1	0,3	0,2	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	1,4	1,4	1,4	1,5	0,2	1,2	
SD	1,1	1,5	1,1	1,7	0,4	1,1	

Tab. 6: MMP-1-Gehalt in den Nährmedien bei Mobiforte®, LOT-Nr. 11/2016L06

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	1,7	n. b.	1,7	1,9	1,7	1,8	1,4
P <sub>2</sub>	1,2	2	2,1	1,6	1,6	2,3	n. b.
P <sub>3</sub>	1,2	4,5	2,4	2,1	1,2	1,2	n. b.
P <sub>4</sub>	n. b.	0,4	0,1	0	0	n. b.	n. b.
P <sub>5</sub>	0	n. b.	0,2	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
P <sub>6</sub>	0,8	1,3	0,5	2,1	0,4	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	1	2	1,2	1,5	1	1,7	
SD	0,6	1,7	1	0,9	0,8	0,6	

**Tab. 5 und 6:** Normalisierter Gehalt von MMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031) und Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016L06) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 7: MMP-1-Gehalt in den Nährmedien bei Mobiforte®, LOT-Nr. 11/2016L07

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]	MMP-1 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	2,6	n. b.	5	4,5	1,9	4,4	3,1
P <sub>2</sub>	2,7	1,3	1,5	3,2	1,4	1,4	n. b.
P <sub>3</sub>	1,9	1,7	1,9	1,5	2	1,5	n. b.
P <sub>4</sub>	0	0	0	0	0,1	n. b.	n. b.
P <sub>5</sub>	0,1	0	0	0	0,1	n. b.	n. b.
P <sub>6</sub>	3,4	0,6	0,6	0,5	0,6	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	1,8	0,7	1,5	1,6	1	2,4	
SD	1,4	0,8	1,9	1,9	0,9	1,7	

**Tab. 7:** Normalisierter Gehalt von MMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von den Mobiforte®-Chargen (LOT-Nr. 11/2016L07) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

### 11.3.4 MMP-3-Gehalt in den Nährmedien

Tab. 1: MMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 5000, LOT-Nr. 1247582

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	9,2	n. b.	113,1	60,1	10,1	10,2	8,5
P <sub>2</sub>	7,6	21,2	20,2	11	11	7,0	n. b.
P <sub>3</sub>	14,1	18,7	15,1	21,4	14,4	17,7	n. b.
P <sub>4</sub>	1,1	230,8	229,3	84,7	31,1	3,6	n. b.
P <sub>5</sub>	4,5	67,1	21,2	21,4	11,1	2,1	n. b.
P <sub>6</sub>	8,7	52	44,8	29,2	15,8	12,9	n. b.
$\bar{x}$	7,5	77,9	73,9	38	15,6	8,9	
SD	4,4	87,9	84,5	28,4	7,9	5,9	

**Tab. 1:** Normalisierter Gehalt von MMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 2: MMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1266793/X

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	3,3	n. b.	3,2	2,4	1,4	0,7	n. b.
P <sub>2</sub>	0,5	0,9	0,1	0,7	0,5	n. b.	n. b.
P <sub>3</sub>	5,3	5,1	5	8	n. b.	n. b.	n. b.
P <sub>4</sub>	0,6	1,4	2,5	0,7	0,7	0,5	n. b.
P <sub>5</sub>	3	4	0,8	1,7	1,0	1,8	n. b.
P <sub>6</sub>	1,4	1,7	1,6	1,4	n.b.	n.b.	n. b.
$\bar{x}$	2,4	2,6	2,2	2,5	0,9	1	
SD	1,9	1,8	1,8	2,8	0,4	0,7	

Tab. 3: MMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1048665

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	10	n. b.	88,7	88,8	16	39,4	27,9
P <sub>2</sub>	8,0	22,7	23,2	21,6	24,4	8,4	n. b.
P <sub>3</sub>	23,9	5,1	37,6	27,0	17,4	23,4	n. b.
P <sub>4</sub>	1,1	238,8	180,9	205,4	245,7	115,1	n. b.
P <sub>5</sub>	1,4	55,9	68,3	62,3	41,3	19,6	n. b.
P <sub>6</sub>	12,7	50,8	89,8	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	9,5	74,7	81,4	81	69	41,2	
SD	8,5	94,1	55,7	74,7	99,3	42,8	

**Tab. 2 und Tab. 3:** Normalisierter Gehalt von MMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Peptan® B 2000-Chargen (LOT-Nr. 1266793/x und 1048665) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.



Tab. 4: MMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei CH-Alpha®, LOT-Nr. L88/1031

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	3,8	n. b.	2,5	4,1	3,1	n. b.	n. b.
P <sub>2</sub>	1,3	1,6	0,6	1,4	1,6	n. b.	n. b.
P <sub>3</sub>	7,7	6,4	12,4	10,9	11,0	n. b.	n. b.
P <sub>4</sub>	1,2	1,8	2,4	1,5	1,4	1,8	n. b.
P <sub>5</sub>	3,2	1,4	2,4	2	4,8	0,9	n. b.
P <sub>6</sub>	1,7	0,6	0,8	1,3	n.b.	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	3,2	2,3	3,5	3,5	4,4	1,3	
SD	2,5	2,3	4,4	3,7	3,9	0,6	

Tab. 5: MMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei CH-Alpha®, LOT-Nr. L115/1031

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	1,6	n. b.	2,6	3	2,2	n. b.	n. b.
P <sub>2</sub>	0,6	1,1	0,8	1,4	0,7	n. b.	n. b.
P <sub>3</sub>	10,4	8,5	10,3	11,2	11,0	n. b.	n. b.
P <sub>4</sub>	2,9	7,1	2,5	1,2	2,6	1,6	n. b.
P <sub>5</sub>	0,3	0,5	0,6	1,6	0,8	1,3	n. b.
P <sub>6</sub>	1,2	1,7	2,9	1,1	n. b.	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	2,8	3,8	3,3	3,3	3,4	1,5	
SD	3,8	3,7	3,6	3,9	4,3	0,2	

**Tab. 4 und 5:** Normalisierter Gehalt von MMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von den CH-Alpha®-Chargen (LOT-Nr. L88/1031 und L115/1031) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1</sub>-P<sub>6</sub>, sowie das arithmetische Mittel ( $= \bar{x}$ ) und die Standardabweichung ( $= SD$ ); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 6: MMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei Mobiforte®, LOT-Nr. 11/2016L06

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	1,9	n. b.	2,3	3,4	3,5	n. b.	n. b.
P <sub>2</sub>	0,4	0,6	0,3	0,6	0,5	n. b.	n. b.
P <sub>3</sub>	8,4	15,3	13,7	11,1	7,8	n. b.	n. b.
P <sub>4</sub>	2,9	2,3	1,6	1,2	1,2	1,2	n. b.
P <sub>5</sub>	1	0,6	0,9	n.b.	n.b.	n.b.	n. b.
P <sub>6</sub>	2,7	2,3	2,7	4,9	n.b.	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	2,9	4,3	3,6	4,2	3,2		
SD	2,9	6,3	5	4,2	3,3		

Tab. 7: MMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei Mobiforte®, LOT-Nr. 11/2016L07

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]	MMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	4,1	n. b.	8,6	11,1	3	n. b.	n. b.
P <sub>2</sub>	1,8	1,6	1,3	2,4	1,2	n. b.	n. b.
P <sub>3</sub>	15	9,6	9	7,7	12,1	n. b.	n. b.
P <sub>4</sub>	1,2	2,1	4	1,8	1,2	0,3	n. b.
P <sub>5</sub>	2,7	4,3	1,4	2,8	1,8	2,1	n. b.
P <sub>6</sub>	2,2	2	2,2	1,8	n. b.	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	4,5	3,9	4,4	4,6	3,9	1,2	
SD	5,2	3,4	3,5	3,9	4,6	1,3	

**Tab. 6 und 7:** Normalisierter Gehalt von MMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von den Mobiforte®-Chargen (LOT-Nr. 11/2016L06 und 11/2016L07) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1</sub>-P<sub>6</sub>, sowie das arithmetische Mittel ( $= \bar{x}$ ) und die Standardabweichung ( $= SD$ ); n. b. = nicht bestimmt.

## 11.3.5 TIMP-3-Gehalt in den Nährmedien

Tab. 1: TIMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 5000, LOT-Nr. 1247582

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	73,9	n. b.	71	70,1	65,1	110,7	54,3
P <sub>2</sub>	37,6	53,5	82,5	41,2	58,9	37,9	n. b.
P <sub>3</sub>	9,2	37,7	63,4	51,2	28,1	56,9	n. b.
P <sub>4</sub>	32,5	38,2	33,4	35,1	28,2	27,3	n. b.
P <sub>5</sub>	77,7	82,3	73,1	112,8	102	78,1	n. b.
P <sub>6</sub>	37,2	50	57,3	47,8	27,9	36	n. b.
$\bar{x}$	44,7	52,3	63,5	59,7	51,7	57,8	
SD	26,3	18,2	17	28,6	29,8	31,7	

Tab. 2: TIMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1266793/X

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	90,7	n. b.	70,2	69,1	93,3	52,1	61,6
P <sub>2</sub>	44,1	50,1	82,4	71,1	41	39,7	n. b.
P <sub>3</sub>	25,5	25,3	64,7	44,5	28,6	42,9	n. b.
P <sub>4</sub>	32,8	46,3	113,9	33,7	45,9	60,8	n. b.
P <sub>5</sub>	111,1	118,6	86	83,3	117,6	118,6	n. b.
P <sub>6</sub>	24,4	66,8	74,7	52,2	54	67,3	n. b.
$\bar{x}$	54,8	61,4	82	59	63,4	63,6	
SD	37	35,2	17,5	18,6	34,5	28,9	

**Tab. 1 und 2:** Normalisierter Gehalt von TIMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Peptan® B 5000 (LOT-Nr. 1247582) und Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1266793/X) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 3: TIMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1048665

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	91,6	n. b.	140,8	85	133,9	94,2	71
P <sub>2</sub>	41,6	57,5	82,6	65,4	68,8	47,3	n. b.
P <sub>3</sub>	36,7	48,4	87,9	51,1	31,4	42,4	n. b.
P <sub>4</sub>	52,7	90,1	21,5	36,3	35,6	32,8	n. b.
P <sub>5</sub>	122,7	124,2	98,6	84,3	102,2	92,8	n. b.
P <sub>6</sub>	43,4	57,1	44,0	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
$\bar{x}$	64,8	75,5	79,2	64,4	74,4	61,9	
SD	34,6	31,6	42	21,1	43,9	29,3	

Tab. 4: TIMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei CH-Alpha®, LOT-Nr. 88/103

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	97,1	n. b.	119,6	173,3	95,7	76,3	121,7
P <sub>2</sub>	49,4	96,5	71,8	56,2	60,5	59,3	n. b.
P <sub>3</sub>	23,5	48,5	74,8	49,7	49,7	48,1	n. b.
P <sub>4</sub>	35,4	76,9	109,1	71,9	62,9	64,7	n. b.
P <sub>5</sub>	117,6	172,5	172,1	112,6	174,2	120,6	n. b.
P <sub>6</sub>	34,4	60,2	52,1	35,2	28,6	63	n. b.
$\bar{x}$	59,6	90,9	99,9	83,1	78,6	72	
SD	38,5	49,1	43,3	51,5	51,7	25,5	

**Tab. 3 und 4:** Normalisierter Gehalt von TIMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Peptan® B 2000 (LOT-Nr. 1048665) und CH-Alpha® (LOT-Nr. 88/103) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel ( $= \bar{x}$ ) und die Standardabweichung ( $= SD$ ); n. b. = nicht bestimmt.

Tab. 5: TIMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei CH-Alpha®, LOT-Nr. L115/1031

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	76,6	n. b.	126	153,2	70,9	99,2	102,3
P <sub>2</sub>	37,7	94,2	71	70,9	54,3	61,1	n. b.
P <sub>3</sub>	23,5	115,2	100,7	63	43,3	33,3	n. b.
P <sub>4</sub>	51,9	114,7	81,3	55,6	46,5	58	n. b.
P <sub>5</sub>	111,6	198,4	114,4	97,4	118,1	111,4	n. b.
P <sub>6</sub>	55,4	93,1	112	43,2	26,8	62,7	n. b.
$\bar{x}$	59,4	123,1	100,9	80,5	60	70,9	
SD	31,2	43,4	21,1	40	31,9	28,9	

Tab. 6: TIMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei Mobiforte®, LOT-Nr. 11/2016L06

	Kontrol- le	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/ Protein [µg]
P <sub>1</sub>	97,1	n. b.	146	150,7	91,8	78,1	73,3
P <sub>2</sub>	38,1	94,9	70	85	50,6	46,6	n. b.
P <sub>3</sub>	36	90,1	80,6	55,6	29,6	31,6	n. b.
P <sub>4</sub>	54,7	106,1	105,9	50	57,1	61,3	n. b.
P <sub>5</sub>	84,9	135,7	357,2	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
P <sub>6</sub>	31,6	41,6	90,1	99,2	37,5	56,7	n. b.
$\bar{x}$	57,1	93,7	141,6	88,1	53,3	54,9	
SD	27,7	34,1	108,9	40,5	24	17,3	

**Tab. 5 und 6:** Normalisierter Gehalt von TIMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von CH-Alpha® (LOT-Nr. L115/1031) und Mobiforte® (LOT-Nr. 11/2016L06) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

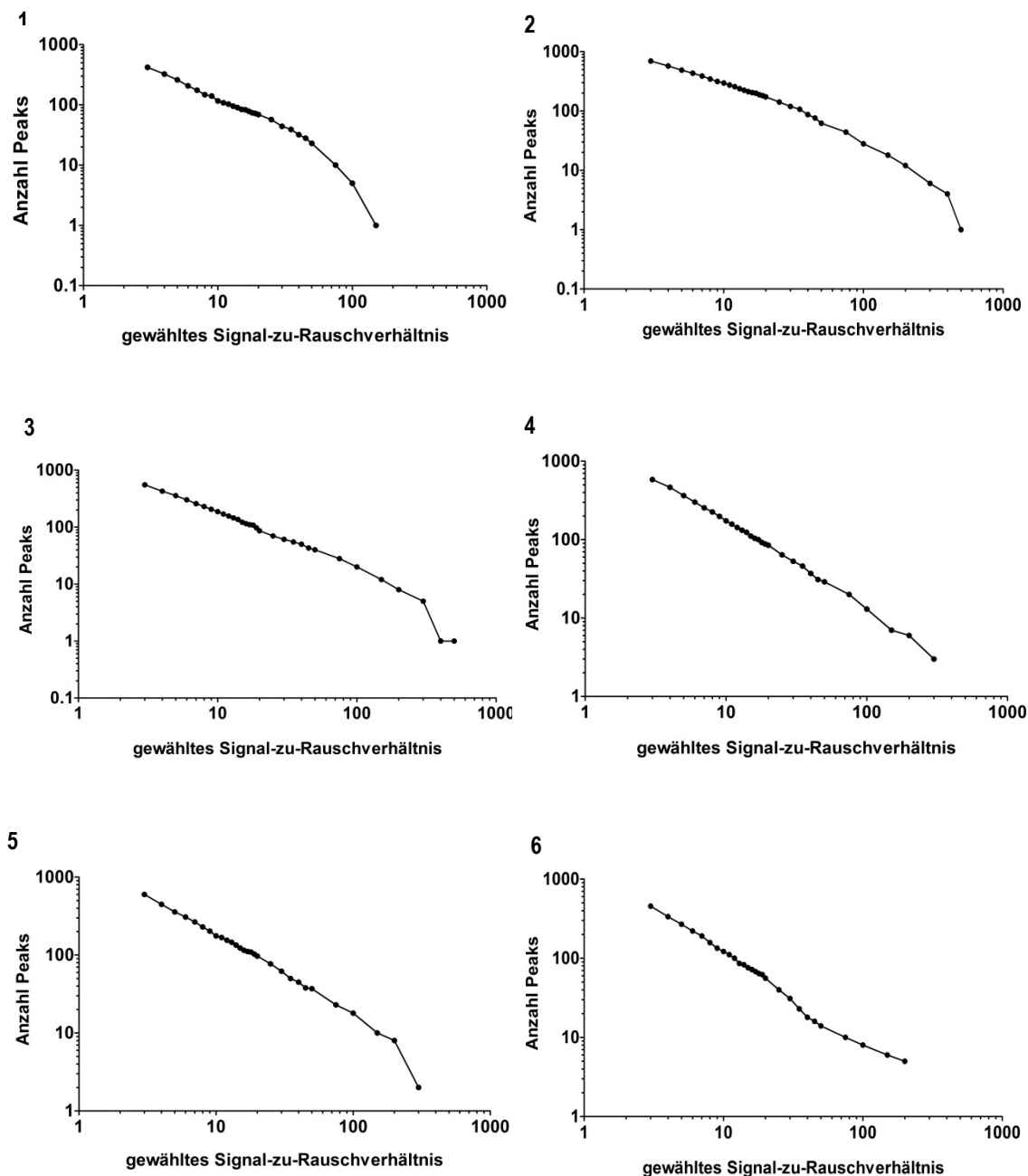
Tab. 6: TIMP-3-Gehalt in den Nährmedien bei Mobiforte<sup>®</sup>, LOT-Nr. 11/2016L07

	Kontrolle	5 mg/ml KH	2 mg/ml KH	1 mg/ml KH	0,5 mg/ml KH	0,1 mg/ml KH	0,05 mg/ml KH
	TIMP-3 [pg]/Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/Protein [µg]	TIMP-3 [pg]/Protein [µg]
P <sub>1</sub>	161,2	n. b.	181,7	187,8	105,7	149,5	159,5
P <sub>2</sub>	69,2	77	75,2	113,1	60,3	65,2	n. b.
P <sub>3</sub>	86,8	70,3	79,4	47,1	60,1	54,7	n. b.
P <sub>4</sub>	41,9	83,7	152,4	64,8	53,8	84,1	n. b.
P <sub>5</sub>	82,3	175,3	169,4	85,8	107,6	97,7	n. b.
P <sub>6</sub>	39,3	60,5	79,4	57,4	74,3	41,8	n. b.
$\bar{x}$	80,1	93,4	122,9	92,7	77	82,2	
SD	44,4	46,6	50,1	52,2	24	38,6	

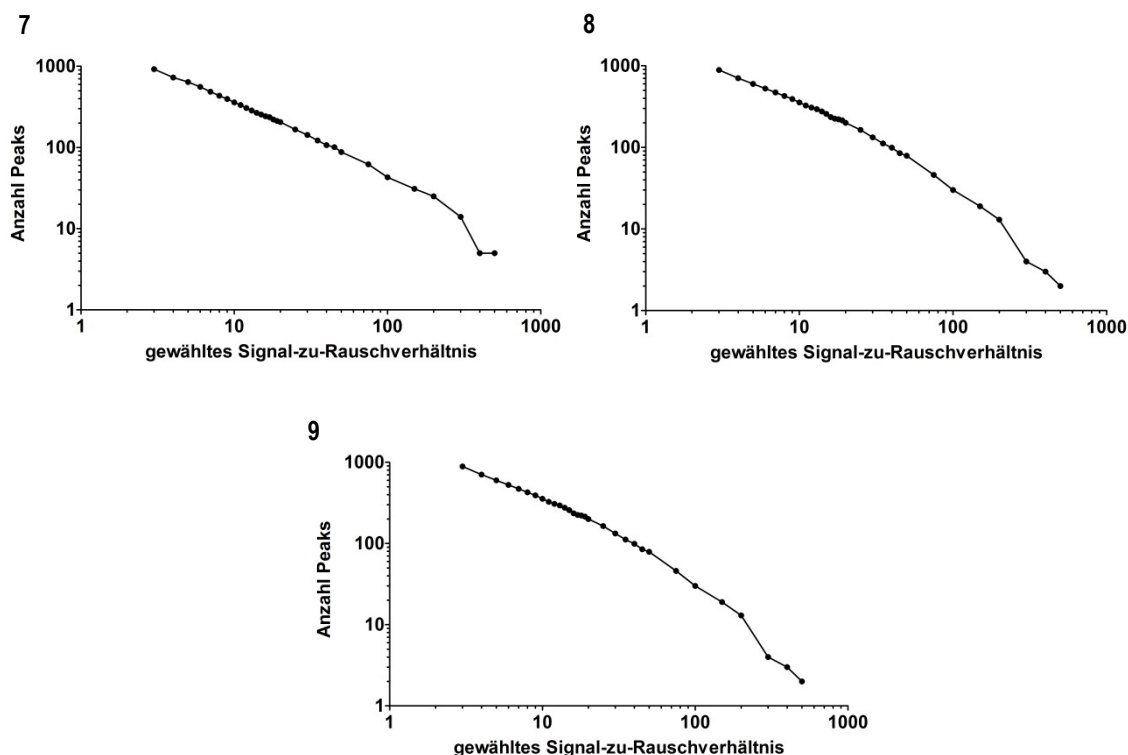
**Tab. 6:** Normalisierter Gehalt von TIMP-3 [pg] in den Nährmedien pro [µg] zellulärem Protein der FLS nach Hinzugabe von Mobiforte<sup>®</sup> (LOT-Nr. 11/2016L07) in unterschiedlichen Konzentrationen [mg/ml]. Dargestellt werden die Messergebnisse der untersuchten Probanden P<sub>1-6</sub>, sowie das arithmetische Mittel (=  $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (= SD); n. b. = nicht bestimmt.

## 12 Graphischer Anhang

### 12.1 Prüfung auf das Vorhandensein eines optimalen S/N

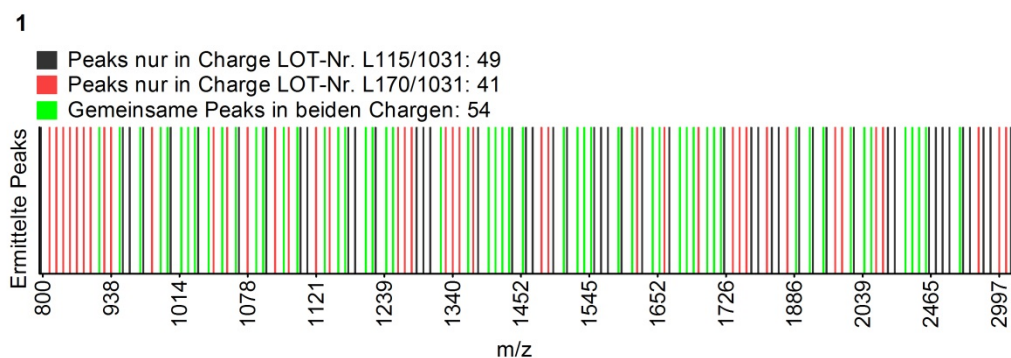


**Abb. 1 - 6:** Dargestellt wird die Anzahl der ermittelten Peaks in den MALDI-TOF-Massenspektren von dem Replikat Nr. 1 des jeweiligen KH-Präparates in Abhängigkeit von dem gewählten Signal-zu-Rauschverhältnis. Peptan<sup>®</sup> F 2000, LOT-Nr. 1010903 (= 1); Mobiforte<sup>®</sup>, LOT-Nr. 11/2016/L06 (= 2); CH-Alpha<sup>®</sup>, LOT-Nr. L115/1031 (= 3), CH-Alpha<sup>®</sup>, LOT-Nr. L88/1031 (= 4), CH-Alpha<sup>®</sup>, LOT-Nr. L170/1031 (= 5), Peptan<sup>®</sup> B 5000, LOT-Nr. 1247582 (= 6).



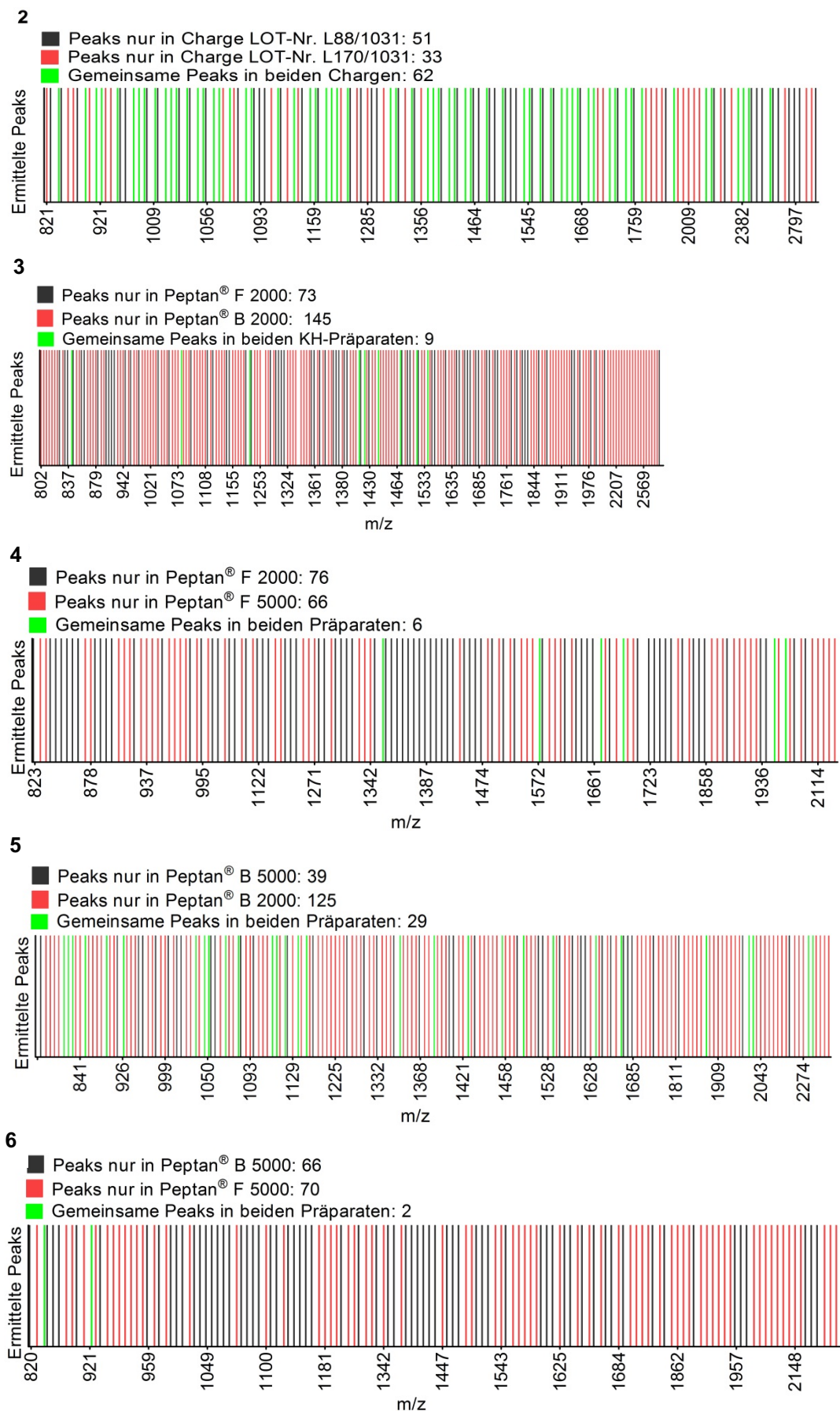
**Abb. 7-9:** Dargestellt wird die Anzahl der ermittelten Peaks in den MALDI-TOF-Massenspektren von dem Replikat Nr. 1 des jeweiligen KH-Präparates in Abhängigkeit von dem gewählten Signal-zu-Rauschverhältnis. Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1048665 (=7); Peptan® B 2000, LOT-Nr. 1048665 (=8), Peptan® F 5000, LOT-Nr. 101372 (=9).

## 12.2 Hauptversuch 1 – Gel-like view-Diagramm



**Abb. 1:** Dargestellt wird der Chargenvergleich von CH-Alpha®-Chargen LOT-Nr. L115/1031 und L170/1031. Gezeigt werden die ermittelten reproduzierbaren Peaks mit ihrer jeweiligen Massenzahl (m/z) in einem Gel-like view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welchem KH-Präparat ein Peak auftrat. Trat ein Peak in beiden Chargen gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Aufgrund der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl jedes zehnten Peaks gezeigt.





**Abb. 2 - 6:** Dargestellt wird der KH-Präparate-/Chargenvergleich von CH-Alpha®-Chargen LOT-Nr. L88/1031 und L170/1031 (= 2); Peptan® F 2000,

---

LOT-Nr. 101903 und Peptan<sup>®</sup> B 2000, LOT-Nr. 1048665 (= **3**); Peptan<sup>®</sup> F 2000, LOT-Nr. 101903 und Peptan<sup>®</sup> F 5000, LOT-Nr. 101372 (= **4**), Peptan<sup>®</sup> B 2000, LOT-Nr. 1048665 und Peptan<sup>®</sup> B 5000, LOT-Nr. 1247582 (= **5**) sowie Peptan<sup>®</sup> F 5000, LOT-Nr. 101372 und Peptan<sup>®</sup> B 5000, LOT-Nr. 1247582 (= **6**). Gezeigt werden jeweils die ermittelten reproduzierbaren Peaks mit ihrer jeweiligen Massenzahl ( $m/z$ ) in einem Gel-like view-Diagramm. Es wird farblich unterschieden, in welchem KH-Präparat ein Peak auftrat. Trat ein Peak in beiden KH-Präparaten/-Chargen gemeinsam auf, so ist dieser grün markiert etc. Aufgrund der Übersichtlichkeit wird in dem Diagramm nur die Massenzahl jedes zehnten Peaks gezeigt.

## 13 Publikationsverzeichnis

### Publikationen

Simons VS, Lochnit G, Wilhelm J, Ishaque B, Rickert M, Steinmeyer J.  
*Comparative Analysis of Peptide Composition and Bioactivity of Different Collagen Hydrolysate Batches on Human Osteoarthritic Synoviocytes*. Sci Rep 2018, 8(1):17733.

Schadow S, Simons VS, Lochnit G, Kordelle J, Gazova Z, Siebert H-C, Steinmeyer J.  
*Metabolic Response of Human Osteoarthritic Cartilage to Biochemically Characterized Collagen Hydrolysates*. Int J Mol Sci 2017, 18(1):207.

### Präsentation Poster

Simons VS, Lochnit G, Wilhelm J, Ishaque B, Rickert M, Steinmeyer J.  
*Peptidische Zusammensetzung und Wirkung von Kollagenhydrolysaten auf humane synoviale Fibroblasten des arthrotischen Kniegelenks – ein Chargenvergleich*  
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2018, Berlin, 23.-26.10.2018

### Vorträge

Simons VS, Lochnit G, Steinmeyer J.  
*Produkt- und Chargenvergleich von Kollagenhydrolysaten – biochemische Zusammensetzung und pharmakologische Wirkung auf humane synoviale Fibroblasten*.  
Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Gießen, 17.03.2015.

## 14 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 15 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. J. Steinmeyer für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit im Labor für Experimentelle Orthopädie wissenschaftlich tätig zu sein. Vor allem danke ich für die exzellente und intensive fachliche Betreuung und die unkomplizierte, freundliche Zusammenarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. G. Lochnit für die Möglichkeit der Durchführung von massenspektrometrischen Analysen im Biochemischen Institut sowie für die freundliche und tatkräftige Unterstützung bei allen Fragestellungen und Herausforderungen.

Weiter danken möchte ich der medizinisch-technischen Assistentin Frau C. Hild für die gute Einarbeitung im Labor für Experimentelle Orthopädie und Ihre Hilfsbereitschaft mit der sie einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat. Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. T. Timm für die Einarbeitung und Hilfestellungen im Biochemischen Institut. Beiden Laborteams danke ich für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Rickert, Ärztlichem Direktor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie und den OP-Teams für die freundliche Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Gewebeproben.

Mein Dank gilt weiter Herrn Dr. J. Wilhelm und Herrn Dr. G. Eichner für die Beratung und Unterstützung bei statistischen Fragestellungen.

Meiner Familie und meinen Freunden und vor allem meiner lieben Ehefrau Evelyn danke ich für die Unterstützung sowie für ihr Verständnis und ihre Geduld.